

Aus der Chirurgischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor und Chefarzt: Professor Dr. med. E. S. Bücherl

ÜBER DIE AUTOLOGE HETEROTOPE MILZTRANSPLANTATION
— Funktionsfähigkeit und Regeneration nach Konservierungsversuchen —

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1969

vorgelegt von

Ulf Stockmann

aus Berlin

Aus der Chirurgischen Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor und Chefarzt: Prof.Dr.med.E.S.Bücherl

ÜBER DIE AUTOLOGE HETEROTOPE MILZTRANSPLAN-
TATION - FUNKTIONSFÄHIGKEIT UND REGENERATION
NACH KONSERVIERUNGSVERSUCHEN -.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulf Stockmann
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr. med. Emil Sebastian B ü c h e r l

Korreferent: Professor Dr. med. Hermann F r a n k e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 6.12.1967

Meinem Vater

Gliederung

I	Einleitung	Seite 5
	Zur Entwicklung der Transplantationsforschung	
	Definition der Begriffe	
	Zur Entwicklung der Gewebekonservierung	
	Über Vorstellungen der schädigenden Mechanismen beim Einfrieren	
	Über protektive Substanzen	
	Über die Transplantation als "Vitalitätstest" konservierten Gewebes	
	Historischer Überblick über die Milztransplantation	
	Eigene Fragestellung	
II	Material und Methodik	Seite 19
	Vorversuch	
	a) autologe heterotope Transplantation von Milzscheiben mit zweizeitiger Splenektomie	
	b) Kontrolle - nur Splenektomie	
	Hauptversuch	
	15 Serien unterschiedlicher Aufbewahrungsart und -dauer von Milzgewebe mit anschließender Transplantation	
III	Ergebnisse	Seite 27
IV	Besprechung der Ergebnisse	Seite 59
	Vorversuch	
	a) Autoradiographie	
	b) Überlebensrate Bartonellen infizierter Tiere	
	Hauptversuch	
	Korrelation zwischen makroskopischen und histologischen Ergebnissen.	
	Diskussion der Ergebnisse im einzelnen:	
	a) nach 1 bzw. 2 h Aufbewahrungszeit bei Zimmertemperatur	
	b) nach 24 h im Kühlschrank	
	c) nach 24 h bzw. 1 Woche im Tiefkühlfach	
	d) nach 1 h Tief-Frieren ("deep-freezing")	
V	Zusammenfassung	Seite 79
VI	Literatur	Seite 82

Die Verpflanzung lebenden Gewebes zum plastischen Ersatz großer Hautdefekte oder die Transplantation ganzer Organe ist eine sehr alte Vorstellung in der Chirurgie. Die ältesten Überlieferungen aus dem 2. vorchristlichen Jahrtausend berichten über die Wiederherstellungschirurgie bei Nasendefekten mit Hilfe von gestielten Hauttransplantaten. Aus dem Mittelalter kennen wir die "italienische Nasenplastik"

(G. TAGLIACCOZZI 1597 "De curtorum chirurgia per insitionem") und die 1794 erstmalig von den Engländern GRUSS und FINDLAY nach einer mündlichen Überlieferung festgehaltene "indische Nasenplastik". (zit. nach WOODRUFF)

Abgesehen von den Transplantationsversuchen John HUNTERS Ende des 18. Jahrhunderts mit Zähnen und Testes, beginnt die Transplantationsforschung am Anfang des 19. Jahrhunderts. Ein kurzer tabellarischer Überblick soll verdeutlichen, welche große Bedeutung man diesem Gebiet der experimentellen Chirurgie beimaß.

ORGAN	AUTOR u. JAHR
Freie Hauttransplantation	BARONIO (1804)
	DIEFFENBACH (1822)
	BUNGER - 1. erfolgreiche autologe Vollhauttr. beim Menschen 1822.
	REVERDIN (1870) OLLIER (1872)
	THIERSCH (1874) ESMARCH (1885)
Freie Nerventransplantation	PHILIPPEAUX u. VULPIAN (1870)
	FLOURENS (1828)
	CUNNINGHAM (1898)
Fett	NEUBER (1893) SILEX (1896)
	CZERNY (1895)
	REHN u. LEXER (ab 1914)

ORGAN	AUTOR u. JAHR
Knochen	OLLIER (1867) BARTH (1893) PHEMISTER (1914)
Cornea	REISINGER (1818 - heterolog) BIGGER (1835 - homolog bei Gazellen) v. HIPPEL (1888)
Gefäße	GLUCK (1882) CARREL (1902) CARREL u. GUTHRIE (1906)
Knorpel	MIDDLEDORF (1852) OLLIER (1867) ZAHN (1877)
Hypophyse	SACERDOTTI (1903) CARERO (1909) CUSHING (1909)
Neben-Niere	CANALIS (1887), um die Jahrhundert- wende sehr viele Autoren.
Schilddrüse	SCHIFF (1884) DOMINICI (1894) v. EISELSBERG (1882) ENDERLEN (1898) CHRISTIANI (1895, 1900, 1901)
Testis	HUNTER (1771) BERTHOLD (1849)
Parathyroidea	CRISTIANI u. FERRARI (1897)
Niere	ULLMANN (1902) CARREL (1902) DECASTELLO (1902)

Die Ergebnisse wurden anfangs allzu optimistisch gewertet und überwertet. Die Vorliebe für die Verpflanzung bradytropher Gewebe mag dies zum Teil erklären. Der Unterschied zwischen heterologer, homologer und autologer Transplantation wurde um die Jahrhundertwende besonders durch die Forschung mit parenchymatösen Organen (Niere) erkannt.

Die großartigen Erfolge der Transplantationsforschung zu Beginn dieses Jahrhunderts, die bewiesen, daß dieses Gebiet nicht nur experimentelle Chirurgie bleiben wollte, wurden ausschließlich mit brady -

trophen Geweben erzielt. LEXER z. B. transplantierte 18 Patienten ein ganzes Kniegelenk hämoplastisch. Nach Jahren sollen 6 mit zufriedenstellendem Erfolg gelebt haben.

Die Entwicklung der operativen Technik, der Anästhesie und die Möglichkeiten des Blutersatz sowie der Hypothermie haben es ermöglicht, die Transplantation der großen parenchymatösen Organe (Lunge, Leber, Herz und Niere) experimentell zu untersuchen.

Lunge	STAUDACHER et al. (1950) JUVENELLE (1951) METRAS (1950) NEPTUNE (1953) BÜCHERL (1959)
Leber	GOODRICH u. WELCH (1956)
Herz	MANN (1933) SIMITSYN (1948) MARCUS (1951) NEPTUNE (1953) - Herz und Lunge en bloc -

Die Transplantation der bradytrophen Gewebe gehört heute zu den therapeutischen Möglichkeiten der Chirurgie (Arterien, Fascie, Knochen, Knorpel, Cornea). Die Überpflanzung der parenchymatösen Organe ist in der Klinik immer noch sehr problematisch oder unmöglich. Die Entwicklung der Nierentransplantation zeigt jedoch, daß die Organtransplantation keine Utopie mehr ist.

Nach den ersten Experimenten von ULLMANN, CARREL, DECASTELLO 1902 wurde 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation beim Menschen von MERILL und Mit. bei eineiigen Zwillingen durchgeführt. Bis zum 15.3.1965 wurden nach BROSIG und NAGEL in der Weltliteratur über 672 Nierentransplantationen beim Menschen berichtet; 121 Patienten waren ein Jahr nach der Transplantation noch am Leben.

Diese Zahlen erhellen schlagartig - trotz der Erfolge - die zum großen Teil noch nicht gelösten Probleme der Transplantationsforschung, die sich schon andeutungsweise an der Definition der Begriffe aufzeigen lassen.

Transplantat: Verpflanztes lebendes tierisches Gewebe ist ein Transplantat. Heute fällt auch unter diesen Begriff devitalisiertes Gewebe (Knochen, Arterien) eines Organismus wenn es verpflanzt wird (WOODRUFF). Manche Autoren verwenden hierfür den Begriff Implantat. DEMPSTER will den Begriff Transplantat für Organtransplantate mit vasculärer Anastomose reserviert wissen. Im Hinblick auf die geläufige Nomenklatur bei Knochen-, Nerven- und Arterientransplantaten schließen wir uns der Definition von WOODRUFF an.

Implantat: DEMPSTER will jede Verpflanzung von Organstückchen - gleich ob vital oder devitalisiert - Implantation nennen. Bei vergleichenden Untersuchungen zu vasculär anastomosierten Organtransplantaten ist diese Definition sehr wertvoll. WOODRUFF definiert nur die Einpflanzung von Metallen oder Kunststoffen als Implantation. In dieser Arbeit wird die Verpflanzung von Organstückchen Transplantation genannt.

Autotransplantat: (Adjektive: autogen, autolog, autoplastisch) Verpflanzung des Gewebes von einer Körperregion zur anderen. Spender und Empfänger sind dasselbe Individuum.

Isotransplantat: (Adjektive: isogen, syngen, isolog) Transplantation zwischen zwei genetisch gleichen (eineiige Zwillinge) oder fast gleichen Individuen ("Vetterntransplantation" bei hochgradig ingezüchteten Laboratoriumstieren).

Homotransplantat; oder Allotransplantat: (Adjektive: homolog, homo- oder allogen (homoio-) plastisch). Verpflanzung des Gewebes zwischen genetisch differierenden Individuen der gleichen Art (z. B. Ratte-Ratte).

Heterotransplantat oder Xenotransplantat: (Adjektive: heterolog, heteroplastisch oder xenogen). Verpflanzung des Gewebes zwischen zwei artfremden Individuen (z.B. Maus-Ratte, Affe-Mensch).

Eine Verpflanzung des Gewebes ist an seinen natürlichen Ort (orthotop) oder an eine fremde Stelle (heterotop, dystop) möglich; z. B. der Herzersatz

mit regelrechter Anastomosierung der anatomischen Strukturen (orthotop) oder das Herz wird in Verbindung mit den Halsgefäßen oder der Bauchaorta (NASSERI et. al.) als zusätzliches zweites Herz transplantiert (dystop).

Die Gewebe sind in ihrer Transplantationsfähigkeit nicht gleich zu beurteilen. So unterscheidet man nach LONGMIRE homostatische und homovitale Gewebe. Unter die homostatischen rechnet man die bradytrophen Gewebe (Arterien, Knochen, Knorpel, Fascie, Nerven), deren Vitalität zum Transplantationserfolg nicht erforderlich ist. Sie dienen im Empfänger als "Leit-schiene" für die Zellen des Wirtes oder wirken statisch-mechanisch. Im Gegensatz dazu stehen die homovitalen Gewebe (Leber, Niere, Herz, Lunge), bei denen die organspezifische Funktion von der lebenden Zelle, der Fähigkeit der Regeneration abhängt.

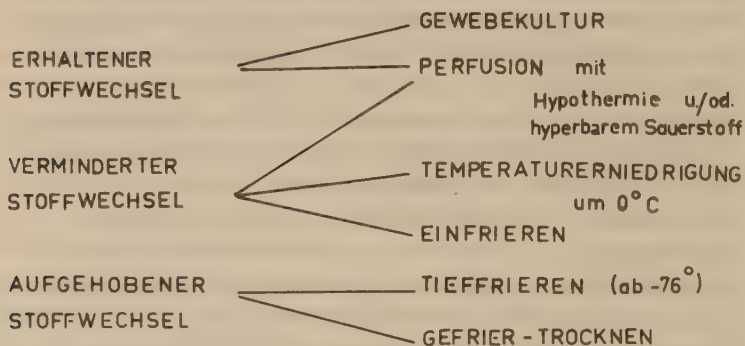
Normalerweise heilt ein Autotransplantat ein, ein Homotransplantat üblicherweise nicht. MEDAWAR hat 1944 durch die "Zweitreaktion" (second set reaction = ein 2. Transplantat vom selben Spender wird vom Empfänger wesentlich schneller abgestoßen) bewiesen, daß es sich bei der Abstoßung eines Transplantates um immunologische Vorgänge handelt. Durch die Histokompatibilitätsgene (GORER u. SNELL) wird die Antigenstruktur des Transplantates geprägt, die beim Empfänger eine streng spezifische Antikörperproduktion induziert. Nach einer Latenzzeit, in der sich ein Autotransplantat vom Homotransplantat nicht unterscheidet, wird das homologe Transplantat durch die Antigen-Antikörper-Reaktion abgestoßen (n. ALLGÖWER u. HULLIGER). Auf die sehr interessanten Aspekte der Immuno-Toleranz (BILLINGHAM, BRENT u. MEDAWAR) soll hier nicht eingegangen werden. Dabei ist allerdings zu betonen, daß die Zukunft der Transplantationsforschung von der Möglichkeit, die Immunbarriere des Individuums überwinden zu können, abhängt.

Unabhängig von der Frage ob und wann die immunbio-

logischen Probleme gelöst werden können, ist schon jetzt abzusehen, daß die klinischen Anwendungsmöglichkeiten des Organersatzes als Therapie entscheidend von den Möglichkeiten Organe aufbewahren zu können abhängt. Die kurzfristige Aufbewahrung - die wenigen Stunden von der Entnahme des Organs bis zur Transplantation beim Empfänger - ohne Schaden der gewünschten Funktion des Organs ist eine selbstverständliche Forderung. Die langfristige Aufbewahrung - die "Gewebebank" mit allen denkbaren Organen - wäre das Ideal.

Die denkbaren Methoden der Aufbewahrung von Geweben basieren entweder auf dem Versuch, den Stoffwechsel des Gewebes oder isolierten Organs zu garantieren, oder durch Unterkühlung den Stoffwechsel zu vermindern oder zu stoppen.

METHODEN DER AUFBEWAHRUNG



Die Methoden, die versuchen den Stoffwechsel völlig aufzuheben, wurden in den letzten 15 Jahren am meisten erprobt. Sie würden uns in die Lage versetzen, Organe in einem Zustand des "Latenten Lebens" über lange Zeit aufbewahren zu können.

Die ersten Versuche, Gewebe bei Temperaturen um 0°C. aufzubewahren, wurden 1903 von WENTSCHER mit

Haut, 1907 von CARREL mit Arterien, 1911 von MAGITOT mit Cornea ausgeführt. CARREL untersuchte als Erster verschiedene Gewebe in unterschiedlichen Aufbewahrungsmedien (1912); mit Haut, Knorpel und Gefäßen hatte er gute Ergebnisse im Gegensatz zur Schilddrüse und Niere (nach WOODRUFF). Als historische Ahnen der Methode des Einfrierens zur Konservierung lebender Gewebe gelten (nach A.U.SMITH) R. BOYLE, der 1683 beobachtete, daß Fische und Frösche kurze Zeit überlebten, wenn das Wasser um sie herum gefroren war und SPALLANZANI (1776), der feststellte, daß Seidenraupeneier mehrere Stunden eine Temperatur von -24°C tolerierten. Untersuchungen zu Beginn dieses Jahrhunderts erbrachten, daß Viren, Bakterien, einige Einzeller und isolierte Zellen von Nicht-Säugetern - z. B. Froschmuskel, Hühnerembryonen-Herz - Erniedrigung der Temperatur unter 0°C vertrugen. Säugetierzellen gehen aber ohne besondere Schutzmaßnahmen zu Grunde (LUYET et al.). Die Entdeckung von A.U. SMITH und CH. POLGE 1948, daß Glycerin Spermien vom Hahn vor den schädigenden Einflüssen des Einfrierens und des Auftauens zu schützen vermag, hat der "Tief-Frier-Forschung" den entscheidenden Anstoß gegeben. Nachdem die protektive Funktion des Glycerins nacheinander an Bullenspermien, Erythrocyten, Ovarien, Testis und Cornea geprüft wurde, erscheint diese Substanz heute als geeignetes Mittel, um Säugetierzellen ohne Schaden einfrieren zu können. LOVELOCK und BISHOP haben in neuerer Zeit die protektive Funktion des Dimethylsulfoxyds an Kälbererythrocyten bewiesen (1959). DMSO ist dem Glycerin in seiner Funktion und relativen Gewebeunschädlichkeit gleichwertig. Friert man Gewebe ein - ohne ein schützendes Agens - ,so geht es zu Grunde. Einfrieren von Zellen auf -196°C ist eine häufig angewandte Methode, Zellmembranen zu zerstören, um Zellextrakte herzustellen.

LOVELOCK hat ein sehr anschauliches Modell zum Ver-

ständnis der Schädigungsmechanismen beim Einfrieren von biologischen Lösungen entwickelt: Es bildet sich ein Gitter von Eiskristallen, das von einem zusammenhängendem Kanalsystem - in dem sich die noch nicht gefrorene elektrolythaltige Flüssigkeit befindet - durchbrochen ist. Mit zunehmender Temperaturerniedrigung nimmt das feste "Eis-Gitter" durch anlagern frierenden Wassers an Raum zu. Dementsprechend nimmt das Kanalsystem der flüssigen Elektrolytlösung ab; dabei nimmt die Konzentration der Elektrolyte - durch das Ausfrieren des Wassers - solange zu, bis am "eutektischen Punkt" das gesamte System gefroren ist. Von der Einfrierengeschwindigkeit hängt der Entstehungsort der Eiskristalle ab: werden Zellen langsam eingefroren, so bilden sich die Eiskristalle ausschließlich extracellulär; beim schnellen Einfrieren jedoch auch intracellulär. LUYET begründete die lange herrschende Ansicht, daß der Hauptschädigungsmechanismus im Entstehen der Eiskristalle zu sehen sei. Die Eiskristalle sollten auf mechanischem Wege zerstörend wirken. LOVELOCK hat durch seine Untersuchungen einen tieferen Einblick in die Problematik vermittelt. Er nimmt als Hauptursache für die Schädigung der Gewebe die Zunahme der Elektrolytkonzentration an, die durch die Auskristallisation des Lösungsmittels Wasser als Eis erklärt ist. Dieser "Osmotische Schock" erklärt besser als LUYET'S Theorie den schädlichen Einfluß des Einfrierens auf die Gewebe. Da bei langsamem Einfrieren die Eiskristalle außerhalb der Zelle entstehen sollen, wäre der schädliche Einfluß der Eiskristalle auf die Zellstrukturen auf mechanischem Wege nicht ohne weiteres vorstellbar. LOVELOCK führt außer der deletären Wirkung der steigenden Elektrolytkonzentration noch weitere Faktoren, die schädlich wirken könnten, an: Der pH-Wert ändert sich. Gelöste Gase wie CO_2 oder freidiffusible Stoffe wie Harnstoff könnten einen toxischen Spiegel erreichen. Durch Wasserentzug kommen die Eiweißstrukturen

in engen Kontakt; Zellwand und intrazelluläre Strukturen können dadurch geschädigt werden. Unabhängig von diesen Vorgängen nimmt LOVELOCK noch einen "Wärme-Schock" an, der durch die Temperaturänderung per se wirken soll. So werden z. B. Bullenspermien bei zu schneller Unterkühlung bei Graden über 0°C irreversibel geschädigt (LOVELOCK).

Das Schicksal einer Zelle während des Einfrierens hängt von mehreren Faktoren ab; so u.a.

1. von der Permeabilität der Zellwand,
2. der Geschwindigkeit des Einfrierens,
3. der Dauer und den Bedingungen der Aufbewahrung,
4. der Geschwindigkeit des Auftauens, und
5. von der Behandlung mit "protektiven" Substanzen (Äthylenglycol, Zucker, Glycerin, DMSO).

Von den "protektiven" Substanzen soll hier nur kurz auf das Glycerin eingegangen werden.

Glycerin, der einfachste dreiwertige Alkohol, kommt als Baustein in fast allen tierischen Fetten und pflanzlichen Ölen vor. Es spielt eine wichtige Rolle beim Fructosestoffwechsel (LEUTHARDT) und bei der Phosphatidsynthese des Organismus. 1779 wurde es von SCHEELE bei der Hydrolyse von Olivenöl entdeckt (nach BEYER). Es ist eine farblose, sirupöse, süß-schmeckende Flüssigkeit vom Siedepunkt 290°C, die sich mit Wasser und Äthanol in jedem Verhältniss mischt, jedoch nicht mit Äther. Glycerin entsteht als Nebenprodukt bei der alkoholischen Gärung. Seine Verwendung ist sehr vielseitig: in der Pharmazie zur Herstellung von Salben; in der Textilindustrie zum Appretieren; bei der Tabakveredelung zum Feuchthalten der Ware; als Bremsflüssigkeit der hydraulischen Bremsen; im Gemisch mit Wasser als Frostschutzmittel; als Weichmacher für Filme und als hygroscopischer Zusatz für Farbbänder und Druckfarben; zur Herstellung von Dynamit und in der Lackindustrie bei der Herstellung von Alkydharzen (nach BEYER).

Der Wirkungsmechanismus der protektiven Substanzen ist noch nicht völlig geklärt. Man weiß, daß zur Schutzfunktion von Glycerin und DMSO die Fähigkeit gehört, durch Zellwände permeieren zu können. So heben z. B. Kupferionen die Schutzfunktion von Glycerin auf, da dann Glycerin in Abhängigkeit von der Temperatur nur sehr langsam oder gar nicht in die

Zelle diffundiert.(LOVELOCK). Die Kristallisationsgeschwindigkeit des Eises und die Kristallisationsform wird durch die schützenden Agentien verändert (REY). Der eutektische Punkt wird erniedrigt. Die Hauptwirkung von Glycerin wird in dem Effekt der "Elektrolytverdünnung" gesehen. LOVELOCK betont, daß die "Abpufferung" der intrazellulären Elektrolyte von besonderer Wichtigkeit sei.

Erst nachdem POLGE, A.U. SMITH und PARKES durch Zufall die Schutzfunktion des Glycerins entdeckt hatten, fand man, daß bei einigen winterfesten Insektenlarven in der Hämolymphe wechselnde Konzentrationen von Glycerin vorhanden sind. Die Glycerinkonzentration ist von der Jahreszeit bzw. Außentemperatur abhängig. Nach einer experimentellen Aufbewahrung bei -5°C von 3 Wochen vermögen Larven der Wespenart *Bracon cephi* Temperaturen um -45°C ohne Schaden zu überstehen; 20-27% Glycerin wird in diesen Larven gefunden (SALT).

Nach den kurzen Bemerkungen über die komplizierten, zum Teil noch unklaren Vorgänge beim Einfrieren und Auftauen lebender Gewebe erscheint es einleuchtend, daß es keine - für alle Gewebearten und Zellen gleichlautende - "Einfriervorschriften" gibt. Für jede Gewebeart muß experimentell das optimale Vorgehen bestimmt werden. Allgemeine Gültigkeit haben nur drei 'Regeln':

1. Regel: Es muß eine schützende Substanz verwandt werden (Glycerin).
2. Regel: Möglich rasches Auftauen ist von Nutzen. Es verhindert die Gefahr der "Rekristallisation" d.h. die Entstehung größerer Eiskristalle aus kleinen - sonst unschädlichen- Kristallisationskernen. Diese Gefahr ist ebenso bei Temperaturschwankungen um -40°C gegeben. Es folgt daraus die
3. Regel: Möglichst konstante Aufbewahrungstemperatur. Alle anderen zu beachtenden Faktoren

missen jeweils ermittelt werden: die Konzentration des Glycerins; die Einfrierungsgeschwindigkeit; die Zusammensetzung der Medien in dem das Gewebe eingefroren wird; die Frage der "kritischen Phase", in dem das Gewebe besonders schwer geschädigt wird; die Aufbewahrungstemperatur; die Aufbewahrungsdauer.

Die Aussagekraft eines Experimentes, in dessen Rahmen Gewebe konserviert wurde, hängt von dem methodischen Vorgehen ab, mit dem man sich bemüht, die Lebensfähigkeit des Gewebes zu beweisen. In der Literatur sind unterschiedliche Methoden beschrieben worden:

1. Das Verhalten nach der Konservierung in der Gewebekultur (ALLGÖWER et al. 1952, POMERAT u. LEWIS 1954).
2. In der Krebsforschung das Verhalten der Tumorzellen in den empfänglichen Tieren; Vergleich der "Tötungsrate" vor und nach dem Aufbewahrungsversuch (HAUSCHKA et al. 1959, TOOLAN et al. 1957).
3. Die Energiequotient-Messung im WARBURG-Apparat (DUANE 1948).
4. Die Prüfung der Organfunktion oder das histologische Bild der Gewebe nach der Transplantation
 - a) autolog (DEANESLY) b) homolog (endokrine Organe SMITH u. PARKES, GAILLARD; Arterien BAIN u.a.).

Wollte man den Grad der Schädigung, den ein Organ durch den Konservierungsversuch erlitten hat, genau abschätzen können, so müßte man das zur Aufbewahrung isolierte Organ dem selben Tier an die selbe Stelle retransplantieren. Diese Versuchsanordnung - die orthotope autologe Transplantation - ließe sich nur an großen Organen mit vasculären Anastomosen durchführen (bei längeren Aufbewahrungszeiten auch nur mit paarigen Organen). Die heterotope autologe Transplantation hätte daher den Vorteil, daß neben einer größeren Organauswahl alle immunologischen Probleme, die bei der homologen Transplantation die Ergebnisse

verfälschen könnten, außer acht gelassen werden können.

Die Arbeiten von E. KNAKE kommen diesen Vorstellungen sehr entgegen. Sie konnte 1952 beweisen - nachdem sie ähnliche Versuche mit Lebergewebe durchgeführt hatte - daß Milzscheibchen autolog auf den Fettgewebkörper des Nebenhodens der Ratte verpflanzt, unbeschränkt am Leben bleiben und ihre organspezifische Struktur behalten. Die Scheibchen waren so dünn gehalten worden, daß sie per diffusionem ernährt werden konnten. Die theoretische Grundlage bildet die von O. WARBURG formulierte Gleichung von der Grenzschnittdicke $d' = \sqrt{8 C_0 \frac{D}{A}}$. Später hat E. KNAKE analoge Ergebnisse von heterotop verpflanzten in Scheibchen geschnittenen Schilddrüsengewebe berichtet (1956). Aus den Arbeiten von E. KNAKE ziehen wir den Schluß, daß für einige Organe - ganz sicher für die Milz - die orthotope Transplantation keine zwingende Voraussetzung darstellt, um histologisch organotypisches Gewebe zu erhalten. In diesem Fall wäre die heterotope Transplantation - unter der Voraussetzung, daß das histologische Bild als Maßstab für die Beurteilung angelegt wird - der orthotopen Transplantation gleichwertig. Die autologe heterotope Transplantation von Milzscheibchen wäre also ein geeignetes Modell, um die Schäden, die durch die Konservierung an diesem Gewebe hervorgerufen werden, abzuschätzen.

Die Angaben über Milztransplantationen in der Literatur sind relativ gering. Das mangelnde Interesse liegt 1. an der lückenhaften Kenntnis ihrer Funktion, die z. T. erst jetzt erforscht wird, 2. an der Tatsache, daß die Milz kein lebenswichtiges Organ ist.

Erläuterung: A = Sauerstoffverbrauch des betreffenden Gewebes je Volumen- und Zeiteinheit.

D= Diffusionskonstante des Sauerstoffs in dem Gewebe. C_0 = Sauerstoffkonzentration an der Grenze zwischen Schnitt und umgebender Lösung (nach KNAKE, 1950).

1881 und 1886 entfernte PHILIPPEAUX erstmalig bei Ratten die Milz und brachte sie ohne jegliche Anastomose als freies Organtransplantat wieder in die Bauchhöhle des gleichen Tieres. Er fand bei der Sektion nur dann Milzgewebe, wenn das Transplantat wieder Anschluß an das Gefäßsystem des Wundbettes gefunden hatte. 1897 hatte ERHARDT mit der Transplantation von 5 - 10 mm großen Milzstückchen in die freie Bauchhöhle nur Mißerfolge (9 Kaninchen, 3 Ratten); wurden die Stückchen im Fettgewebe fixiert, erhielt er histologisch normal strukturiertes Gewebe (2Tiere). Bei 7 Kaninchen verpflanzte er das Organ zwischen Bauchdecke und Fascie zweizeitig mit gutem Erfolg. CARREL führte 1907 erstmalig bei Hunden die Transplantation mit vasculärer Anastomose aus (6 Homo-, 2 Autotransplantate). Nur bei einem Hund wurde nach 8 1/2 Mon. eine Biopsie vorgenommen; das Autotransplantat erschien unverändert.

Die Organwahl bei der Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit wurde noch durch ein aus der Literatur bekanntes Phänomen bestimmt. 1896 berichtete ALBRECHT über einen Fall, bei dem er über das gesamte viscerele und parietale Peritoneum verstreut insgesamt ca. 400 Milzartige Gebilde fand. SCHILLING (1907), KÜTTNER (1910) und FALTIN (1910) berichteten über ähnliche Beobachtungen und diskutierten ausführlich die Genese dieser "Nebenmilzen". PUTSCHAR bewies 1931, daß die Entstehung dieser "Nebenmilzen" in einer spontanen Autotransplantation nach traumatischen Milzzertrümmerungen zu sehen sei. Eine exakte Zusammenstellung der 23 bis 1953 bekannten Fälle, die diesen Beweis eindrucklich erneuert, stammt von STORSTEN et al.. Ein Jahr später berichtete GARANELLA über den 24. Fall von "splenosis"; so lautet der Terminus, der sich für dieses Phänomen der posttraumatischen Milztransplantation in der englisch-schreibenden Literatur eingebürgert hat. Die "splenosis" ist neben der Metastasierung von Tumoren und der Endometriose eines der wenigen in der Natur vorkommenden Transplantationsbeispiele.

In der vorliegenden Arbeit wird zu folgenden Fragen Stellung genommen:

1. Hat die Transplantation von Organscheibchen einen Sinn?
2. Ist sie nur von theoretischem Interesse - oder ist es möglich, ein "funktionierendes Organ" durch die Verpflanzung von Organstückchen aufzubauen?

Diese Fragen sollen nach Möglichkeit durch den Vorversuch beantwortet werden. Es wird versucht werden, eine Korrelation zwischen morphologischem Substrat und Funktion des verpflanzten Gewebes herzustellen. Gleichzeitig soll uns der Vorversuch in die Lage versetzen, histo-morphologisch erkennbare Schädigungen des Gewebes als transplantationsbedingt (z. B. durch das mechanische Trauma des Scheibchenschneidens, durch die Kreislaufunterbrechung oder durch die Heterotopie) oder als Folgen der Gewebeaufbewahrung abschätzen zu können.

Sollte es sich zeigen, daß die Scheibchentransplantation ungeschädigten Gewebes mit gutem Erfolg ein "Organ" an fremder Stelle des Körpers aufbauen kann, so wäre diese Methode geeignet, für dieses Gewebe die Frage des Hauptversuches zu beantworten:

Läßt sich die Ischaemiezeit von Milzgewebe so wirkungsvoll verlängern, daß man von Gewebekonservierung sprechen könnte?

Material und Methodik

I. Vorversuch: Serie A. 18 weißen Händlerinnen (Stamm Sprague-Dawley) beiderlei Geschlechte wurde die halbe Milz reseziert. Die entnommene Milz wurde mit einer Rasierklinge in 12 - 15 dünne Scheibchen geschnitten und den Tieren so schnell wie möglich unter die Rückenhaut autolog transplantiert. Nach 4 Wochen wurde bei einem zweiten Eingriff die Restmilz entfernt. Nach wiederum 4 Wochen wurde 15 Tieren dieser Serie 0,3 - 0,4 ml homologes mit Cr⁵¹ inkubiertes Blut in die Schwanzvene injiziert. Den Tieren wurde ein Zahnfilm auf den Rücken geklebt, um autoradiographisch die Funktion der "Rucksackmilz" eventuell nachweisen zu können. Die Filme wurden 2 Tieren nach einem Tag, 3 Tieren nach zwei Tagen und den restlichen Tieren nach 3 Tagen abgenommen und entwickelt. Anschließend wurden die Tiere mit Äther getötet und sezirt. Es wurde insbesondere darauf geachtet, ob makroskopisch Milzreste im Abdomen nachzuweisen waren oder nicht. Die auf den Rücken transplantierten Milzscheibchen wurden entnommen und histologisch untersucht (fixiert in 10% Formalin, Paraffineinbettung, Schnittdicke 5 μ , Färbung mit Hämalaun-Eosin und nach v. Gieson).

Serie B. 18 Ratten wurden der Splenektomie unterworfen. Am 6. postoperativen Tag wurde 13 Tieren durch Abschneiden der Schwanzspitze Blut entnommen, je ein Blutausschrieb angefertigt und nach Giemsa gefärbt. Kamen die Tiere ad exitum, so wurden sie an dem entsprechenden Tag sezirt. Die überlebenden Tiere wurden nach 4 Wochen getötet und sezirt.

Technik der Milzresektion und Splenektomie (s. Skizze 1)

In Äthernarkose wurde nach entsprechender Vorbereitung (Rasur, Hautdesinfektion mit Merfen) in rechter Seitenlage durch einen pararectal Schnitt von 1,5 - 2,0 cm Länge eingegangen. Die Milz wurde hervorluxiert; die Hälfte der fächerförmig zur Milz ziehenden Gefäße wurden mit einem Catgutfaden (Größe 4-0) ligiert,

der anschließend einmal um die Milz geschlungen wurde. Dabei wurde versucht, den Faden so fest wie möglich zu knoten, ohne in das Organ einzuschneiden. Etwa 2-3 mm medial des Fadens wurde die Milz reseziert. Bei der Splenektomie wurden die Milzgefäße mit 2 Fäden - möglichst unter Schonung des angrenzenden Pankreasgewebes - unterbunden. Die Bauchdecken wurden zweischichtig verschlossen; auf einen Verband wurde verzichtet.

Technik der Gewinnung der Milzscheibchen

Die resezierte Milz wurde mit der konvexen Seite nach unten auf eine sterilisierbare Kunststoffplatte gelegt, mit einer Pinzette auf dieser durch leichten Druck (ohne daß die Milz von der Pinzette gefaßt wurde) gehalten und dann mit einer Rasierklinge in höchstens 1 mm dünne Scheibchen geschnitten (s. Skizze 2). Die Rasierklinge wurde nicht sterilisiert, sondern - um sie möglichst scharf zu haben - 1 h in 70%-igen Äthylalkohol gelegt.

Technik der Transplantation

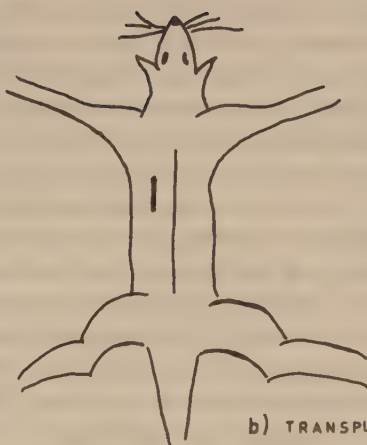
Nach Umlagerung wurde paravertebral subscapulär ein knapp 1,5 cm langer Hautschnitt gelegt (s. Skizze 1b). Das subcutane Fettgewebe wurde durchgetrennt. Die Milzscheibchen wurden direkt auf die Muskelfascie gelegt. Es wurde nicht versucht, die Scheibchen zu fixieren. Während der Zeit, die verging, um die Bauchhöhle zu verschließen und das Transplantatbett zu präparieren, wurden die Milzscheibchen in 0,9%-iger NaCl-Lösung bei 4° C aufbewahrt; sie betrug 5-7 Minuten.

Technik der Markierung der Erythrocyten

Eine 350 g schwere Ratte wurde durch ein Carotiskatheter entblutet. Das gewonnene Blut (5,5 ml) wurde mit 50 μ C Cr₅₁ eine 1/2 h bei 49°C inkubiert und danach den Tieren durch die Schwanzvene injiziert. Die Injektion war bei einem Tier nicht einwandfrei.



a) MILZRESEKTION



b) TRANSPLANTATION

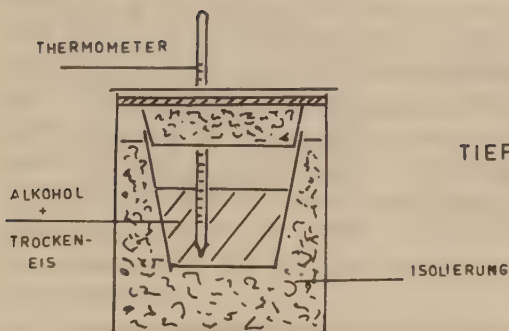
SKIZZE 1 OPERATIVES VORGEHEN

LAGERUNG DER TIERE UND SCHNITTFÜHRUNG



SKIZZE 2

LAGERUNG DER MILZ BEIM
SCHEIBCHENSCHNEIDEN



SKIZZE 3

TIEFFRIERAPPARAT

Technik der Aktivitätsmessung

1 und 2 Stunden nach der Injektion der markierten Erythrocyten wurde mit einem Geiger-Müller Zählrohr geprüft, ob sich Aktivitätsunterschiede zwischen dem Transplantationsort der "Rucksackmilz" und den übrigen Körperpartien feststellen lassen. Etwa 4 Stunden nach der Injektion wurde den Tieren ein Zahnfilm (3x4 cm, Agfa-Gevaert) mit einem breiten Leukoplaststreifen, der in mehreren festen Touren circular um den Körper der Ratten geführt wurde, auf den Rücken geklebt. Die Filme wurden in den genannten Abständen entwickelt; eine Schwärzung, die topographisch der gut palpablen "Rucksackmilz" entsprechen mußte, wurde als Hinweis vermehrter Aktivität dieses Gewebes angesehen.

II. Hauptversuch

In 15 Serien wurden an 146 Ratten Milzscheibchen nach unterschiedlicher Aufbewahrungszeit in verschiedenen Lösungen autolog heterotop transplantiert. (s. Tabelle 1). Nach der beschriebenen Technik wurde ein Drittel der Milz reseziert; davon wurden Rasiermesserschnitte angefertigt und die dünnsten 2-3 Scheibchen für den Versuch verwandt. Nach der Aufbewahrung wurden die Milzstückchen wie beschrieben unter die Rückenhaut transplantiert. Von jeder Serie wurden im allgemeinen je 3 Tiere nach 1 Woche, 2 Wochen und 4 Wochen getötet und das transplantierte Gewebe entnommen, histologisch aufgearbeitet und untersucht. Bei jedem Tier wurde zum Vergleich ein histologisches Präparat der frisch resezierten Milz angefertigt. Wurde Milzgewebe eingefroren (Serie D, E, F, J - O), so wurde ein Präparat direkt nach der Aufbewahrung zum Vergleich hergestellt.

Technik der Aufbewahrung bei den Serien A-I

Die Milzscheibchen wurden in offenen Bechergläsern in 50 ml Flüssigkeit (Macrodex 6%, Rheomacrodex 10%, 0,9% NaCl) aufbewahrt. Die Gläser wurden mit steriler Gaze bedeckt. Es wurde kein Antibiotikum zugesetzt. Das Gewebe wurde bei Zimmertemperatur ($22^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$) oder im Kühlschrank ($4,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) oder im Tiefkühlfach des Kühlschranks (um -13°C) aufbewahrt.

Waren die Scheibchen eingefroren - Serie D und F - so wurden die Bechergläser in 40°C warmes Wasser gestellt, die Scheibchen möglichst rasch vom frei gewordenen Eisblock entfernt und transplantiert.

Technik des Tief-Frier-Verfahrens (-76°C)

Zwei Milzscheibchen wurden in einem Gläschen (Wandstärke: 1,2 mm, Füllvolumen: 4,2 ml Wasser) in 3,0 ml bzw. 3,2 ml Flüssigkeit (s. Tabelle 1) eingefroren. Die Gläschen blieben vor dem Tief-Frieren 1 h geöffnet stehen; danach wurden sie mit einem Gummistopfen verschlossen und an einem Faden in das Gemisch aus 96%-igem Isopropylalkohol und Kohlensäureschnee geworfen. Der Faden war mit einem Leukoplastfährnchen, das mit der Tiernummer gezeichnet war, markiert. Die Temperatur wurde mit zwei Thermometern gemessen; sie zeigten -76°C an.

Das Gewicht der Milzscheibchen wurde bestimmt, indem die Gläschen mit der Flüssigkeit vor und nach Beschickung mit dem Gewebe gewogen wurden. Es betrug im Durchschnitt 0,062 g (die größte Schwankung lag zwischen 0,110 g und 0,032 g).

Den Apparat zum Tief-Frieren stellten wir im Prinzip nach den Angaben von GERICKE und ENGELBARTH her. Ein 5-Ltr. Kunststoffeimer wurde in einen 12-Ltr. Eimer gestellt; der Hohlraum wurde zur Isolierung dicht mit Schaumstoff ausgestopft. Nach oben wurde der Wärmeaustausch durch einen dreifachen Deckel aus Schaumstoff, Kork und Blech erschwert, in dem nur eine Aussparung für das Thermometer gelassen war. (s. Skizze 3)

Der Temperaturabfall wurde mit einem Thermoelement,

das durch den Gummistopfen eines Testgläschens geführt war, über ein Unigor 3 Gerät der Fa. Goerz Electro A.G. Wien I abgelesen. Über die Geschwindigkeit des Temperaturabfalls orientiert Kurve 1; so wurden z.B. -46°C in 80 sec. erreicht.

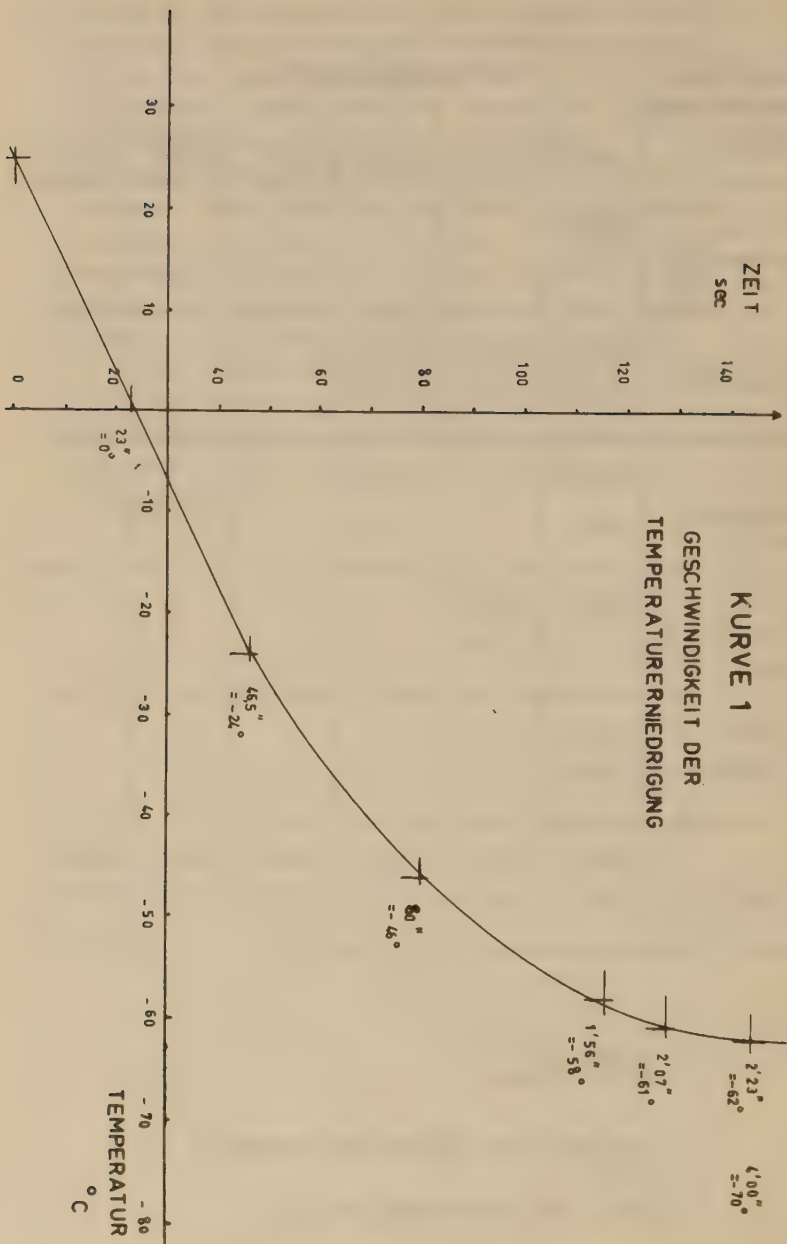
Das Gewebe wurde in allen Serien L-O 1 h bei -76°C belassen. Danach wurde es möglichst schnell wieder aufgetaut: die Gläschen wurden in 40°C warmes Wasser geworfen. Sobald der Eiskern kleiner als die Öffnung des Gläschens erschien, wurde der Stopfen entfernt und die Milzscheibchen samt Eiskern in $35^{\circ} - 39^{\circ}\text{C}$ warme Kochsalzlösung geschüttet. Der Auftauvorgang dauerte so weniger als 2 Minuten. Anschließend wurden die Milzscheibchen so schnell wie möglich den Tieren autolog unter die Rückenhaut transplantiert.

AUFBE - WAHRUNGS- MODUS	SUSPENSIONSMEDIEN					
	MACRODEX 10%	RHEO- MACRODEX 10%	0,9% NaCl	16,6 Vol% GLYZERIN in NaCl	25,5 Vol% GLYZERIN in NaCl	16,6 Vol% GLYZERIN in Macrodex
1 h bei ZIMMERTEMP. (+22° ± 2° C)	SERIE A 10 TIERE					
2 h bei ZIMMERTEMP.	SERIE B 10 TIERE	SERIE H 9 TIERE	SERIE I 9 TIERE			
24 h im KÜHLSCHRANK (+5° ± 1° C)	SERIE C 9 TIERE		SERIE G 10 TIERE			
24 h im TIEFKÜHLFACH (-13° ± 3° C)	SERIE D 10 TIERE	SERIE F 10 TIERE				
1 WOCHE im TIEFKÜHLFACH	SERIE E 9 TIERE					
1 h "deep-freezing" (-76° C)	SERIE L 10 TIERE	SERIE M 10 TIERE	SERIE N 10 TIERE	SERIE J 10 TIERE	SERIE K 10 TIERE	SERIE O 10 TIERE

TABELLE 1

ÜBERBLICK ÜBER DIE SERIEN
DES HAUPTVERSUCHES

KURVE 1 GESCHWINDIGKEIT DER TEMPERATURERNIEDRIGUNG



ERGEBNISSE

Vorversuch

S e r i e A:

Überlebenszeit. Alle Tiere überlebten den Eingriff der Milzresektion und der Transplantation der 12-15 Rasiermesserschritte auf die Rückenmuskulatur. Dieselben Tiere überstanden alle die Relaparotomie und Exstirpation der Restmilz nach 4 Wochen. Von 15 Tieren, die nach weiteren 4 Wochen dem Autoradiographieversuch unterworfen wurden, starben innerhalb von 4 Tagen 8 Tiere (s. Tabelle 2).

Sektion. Bei 18 Ratten fand sich in einem Fall eine ca. 2 mm im Durchmesser große Restmilz im Abdomen. In den anderen Fällen war makroskopisch kein Milzgewebe in der Bauchhöhle nachweisbar. Die "Rucksackmilz" war in jedem Falle nach der Fellrasur bläulich schimmernd durch die Rückenhaut zu sehen. Die Milzscheiben waren zu 2-3 (selten mehr) dicht nebeneinander liegenden, kuglig oder walzenförmigen Gebilden verschmolzen. Man sah feine Blutgefäße zu diesen Gebilden hinziehen, die in der Farbe normalem Milzgewebe völlig glichen. In keinem Fall waren die Transplantate von einer derben Narbe umgeben. Quantitativ war das Gewebe - fast 9 Wochen nach der Transplantation - deutlich weniger als zum Zeitpunkt der Einpflanzung. Vergleiche zwischen den Feuchtgewichten lassen abschätzen, daß $1/4$ bis max. $1/3$ der ursprünglichen Menge vorgefunden wurde.

Histologie. Histologisch findet man normales Milzgewebe mit regelrechter roter und weißer Pulpa. Das Gewebe ist von bindegewebigen Septen (v. Gieson-positiven Strängen), die z. T. Gefäße mitführen, durchzogen. Hin und wieder ist das Narbengewebe im Zentrum des angeschnittenen Gewebes deutlicher ausgeprägt; z. T. ist es durch Fettzellen ersetzt und aufgelockert.

TABELLE 2
 METHODIK UND ERGEBNISSE
 DES VORVERSUCHES

SERIE A	EXPERIMENTELLES VORGEHEN	ZAHL DER GE- STORBENEN TIERE
18 TIERE	1. MILZRESEKTION SCHEIBCHEN "RUCKSACKMILZ"	_____
	2. RELAPAROTOMIE: EXSTIRPATION DER RESTMILZ	_____
	3. AUTORADIOGRAPHIE (Cr ₅₁)	8 von 15
SERIE B	SPLENEKTOMIE	10 von 18

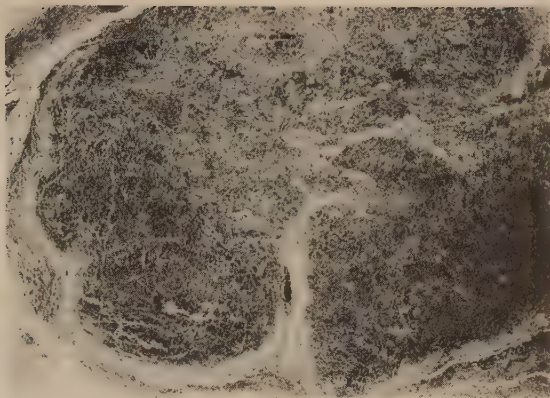


Abb. 1. "Rucksackmilz" (1:40): Intaktes Milzgewebe; hier 2 Scheibchen getroffen. Schmäler Saum lymphatischen Gewebes außerhalb der Transplantate - deutlich bei 5 und 11 Uhr.

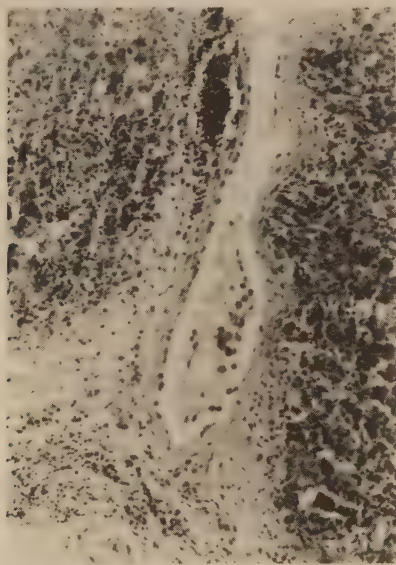


Abb. 2. Ausschnitt aus Abb. 1 (1:160); in dem Bindegewebe zwischen den Milzscheibchen angeschnittene Gefäße. Neben dem großen venösen Gefäß ein kleineres, in dem nur Lymphocyten sind.

Das angeschnittene Gewebe ist von mehreren Milzscheibchen aufgebaut; die Bindegewebsstränge trennen sie. Diese neue Einheit ist von einer dünnen Kapsel umgeben. Zwischen dieser Kapsel und dem Transplantationsbett (Muskulatur oder Fettgewebe) findet sich oft ein schmaler Saum lymphatischen Gewebes. Um größere Blutgefäße sieht man es häufig. Dieses lymphatische Gewebe steht manchmal deutlich sichtbar durch eine Lücke der dünnen Kapsel mit dem Transplantat in Beziehung. Die Umgebung des transplantierten Gewebes ist unauffällig und grenzt direkt entweder an den lymphatischen Saum oder an die Kapsel. Die Blutgefäße sind in großer Zahl angeschnitten und prall mit Erythrocyten gefüllt. Manchmal ist ein Lymphgefäß mit weißen Blutzellen gefüllt getroffen (s. Abbildung 1 und 2).

Bei den histologischen Präparaten der Tiere, die nach dem Autoradiographieversuch starben, war öfters eine erhebliche frische Schädigung im Zentrum des Transplantates zu sehen. Die Strukturierung der roten Pulpa in Markstränge und mit Erythrocyten gefüllten Sinus war aufgehoben. Die Zellkerne waren an Zahl geringer, meist pyknotisch aber auch zum Teil karyolytisch. Es fanden sich Chromatinreste. Die Lymphocyten waren im Zentrum deutlich vermindert und sehr pyknotisch. An der Peripherie des Transplantates war das Gewebe ungeschädigt.

Autoradiographie. Der Versuch mit Cr₅₁ markierten und hitzealterierten Erythrocyten die Funktion des transplantierten Milzgewebes nachzuweisen gelang nicht. Bis 2 h nach der Injektion der markierten Erythrocyten war die lokale Aktivität auf dem Rücken nicht meßbar erhöht. Die anschließend den Tieren aufgeklebten Filme zeigten in keinem Fall eine Schwärzung. 5 Tieren gelang es, den Film zu lockern und anzuknabbern; dadurch wurden die Filme belichtet. 2 Tiere fraßen den Film auf.

S e r i e B:

Überlebenszeit. Nach der Splenektomie starben innerhalb von 9 Tagen 10 von 18 Tieren.

Blutausstriche von 13 Tieren vom 5. postoperativen Tag ließen bei allen Tieren mehr oder weniger stark den Befall der Erythrocyten von Bartonellen erkennen. Man sah faden- oder T-förmige Auflagerungen in dem Zentrum der Erythrocyten.

Sektion. Der Sektionsbefund stimmt mit der hämatologisch zu stellenden Diagnose - Bartonellenanämie - überein: deutliche Blässe der parenchymatösen Organe; oft blutiger Urin in der Blase (besonders bei rasch verstorbenen Tieren); seröse Ergüsse in den Körperhöhlen; manchmal (bei den spät verstorbenen Ratten) kleine weniger als stecknadelkopfgroße Herde weichen nekrotischen Materials in der fleckig-gelblichen Leber.

Hauptversuch

Makroskopische Ergebnisse

S e r i e A: (1h in Macrodex 6% bei $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Die Transplantate verlieren im Laufe der Beobachtungszeit etwas an Größe. Die Farbe ist anfangs blaß-rot; nach 2 Wochen ist sie meist, nach 4 Wochen immer dunkelblau-rot. Sie gleicht der Milzfarbe in situ.

S e r i e B: (2 h in Macrodex 6% bei $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Kein Unterschied zur Serie A. Die Transplantate gewinnen ihre Milzfarbe nach 2 Wochen zurück; sie erscheinen etwas geschrumpft. Bei dieser Serie sieht man besonders deutlich Blutgefäße des umgebenden Gewebes zu den Milzscheibchen ziehen.

S e r i e C: (24 h in Macrodex 6% bei $5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Die Transplantate schrumpfen stärker als in den Serien A und B. Sie gewinnen die Milzfarbe seltener und später zurück; nach 2 Wochen sind die Transplantate immer noch blaß-rot. In mehreren Fällen sieht man am Ort der Transplantation eine Fettgewebsvermehrung.

S e r i e D und E: (24 h bzw. 1 Wo. bei $-13^{\circ} \pm 3^{\circ}$ in Macrodex 6%)

Es ist in den Ergebnissen dieser beiden Serien kein Unterschied. Die Transplantate waren in über 3/4 der Fälle nicht eindeutig erkennbar. Nur auf Grund der Kenntnis des Transplantationsortes wurde "auf Verdacht" Gewebe excidiert. Dabei war die lokale Vermehrung des Fettgewebes zusätzlich von Nachteil. Bei dem Rest der Fälle fand sich ein gelblich-bräunliches, gut stecknadelkopfgroßes Gewebe, das Catgutrest täuschend ähnlich sah. Ein Tier war nach einem Tag gestorben; in diesem Fall war die Größe der Milzscheiben unverändert. Die Farbe war jedoch lehm-gelb.

Serie F: (24 h in Rheomacrodex 10% bei $-13^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$).

Diese Serie weicht nicht von den Serien D und E ab.

Serie G: (24 h in 0,9% NaCl bei $5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$)

Kein wesentlicher Unterschied zur Serie C. Allerdings konnte man mehrmals kleine Hämatome am Transplantationsort sehen. In einem Fall sah man makroskopisch die Scheibchen am Rande des Hämatoms, nachdem das Blut abgeflossen war; jedoch stark geschrumpft.

Serie H und I: (2 h in Rheomacrodex 10% bzw. 0,9% NaCl bei 22°C).

Im Prinzip zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zur Serie B. Durch einige kleine Hämatome, von denen eines superinfiziert erschien, war bei insgesamt 4 Tieren das Ergebnis nicht verwertbar. Bei den vorgefundenen Transplantaten war die Tendenz, die Milzfarbe wiederzuerlangen, deutlich. Der Größenverlust war wie bei der Serie B zu beobachten.

Serie J-O: ("deep-freezing" - 1 h - 76°C in verschiedenen Medien) s. Tabelle 3.

In allen sechs Serien in denen das Milzgewebe tiefgefroren wurde, war der makroskopische Aspekt der Transplantate gleich: Die Transplantate waren von gelblich-bräunlicher Farbe; sie waren geschrumpft, aber nicht so stark wie in den Serien D-F. Wurden die Scheibchen gut ausgebreitet vorgefunden, so waren sie hauchdünn. Lokale Fettgewebsvermehrung wurde in diesen Serien nicht beobachtet. Der Größenschwund verstärkte sich von der 1. zur 4. Woche. Im Prinzip waren jedoch die Veränderungen nach der 1. Woche - ähnlich wie bei den Serien D-F - bereits abgeschlossen. Veränderungen im Sinne der Regeneration konnten nie vermutet werden.

	MACRODEX 6 %	RHEO- MACRODEX 10 %	0,9 % NaCl	16,6 Vol % GLYZERIN	25,5 Vol % GLYZERIN	16,6 Vol % GLYZERIN + Macrodex
1 h ZIMMERTEMP.	A Transplantat geschrumpft milzfarben					
2 h ZIMMERTEMP.	B H I Transplantat geschrumpft milzfarben einsprossende kleine Fetäße Hämatome					
24 h KÜHLSCHRANK	C G Transplantat deutlich geschrumpft Farbe milzähnlich vermehrt kleine Fettgewebe Hämatome					
24 h TIEFKÜHLFACH	D F gelbliche, kaum erkennbare sehr stark geschrumpfte Transplantate vermehrt Fettgewebe					
1 Woche TIEFKÜHLFACH	E s. D + F					
1 h "deep-freezing"	L	M	N	J	K	O
	Transplantate stark geschrumpft, hauchdünn gelblich-bräunlich (Catgut - färben)					

TABELLE 3

ÜBERBLICK ÜBER DIE MAKROSKOPISCHEN
ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHES

Histologie

S e r i e A und B: (1h bzw. 2 h in Macrodex 6% bei $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$).

Nach 1 Woche Transplantationszeit erscheint das Milztransplantat auch histologisch geschrumpft. Das Gewebe läßt die gewohnte Milzstruktur vermissen. Die Kapsel ist deutlich verbreitert und hyalin verdickt. Man sieht keine Malpighi'schen Körperchen oder Lymphfollikel. Die Capillaren der Lymphfollikel sind verschwunden; man kann die Malpighi'schen Körperchen oft gar nicht oder nur noch an der weitgehend hyalinierten Zentralarterie und dem darum gelagerten fibroisierten Grundgerüst erkennen. Das Reticulumnetz ist weitgehend kollagenisiert und fibrosiert. Die Reticulumzellen sind im Ganzen turgorarm und wirken meist wie Fibrocyten. Im Zentrum des Transplantates sieht man keine Sinus. Zwischen den Reticulumzellen findet sich eine blasse, eiweißartige gekörnte Substanz. In den Randpartien des Transplantates sind deutlich Sinusoide erkennbar, die reichlich mit Erythrocyten gefüllt sind. Das transplantierte Gewebe grenzt sich gut vom Muttergewebe ab. Um das Transplantat findet sich eine mäßig starke chronische zellulär-infiltrierende Entzündung mit Lymphocyten, Plasmazellen, eosinophilen Zellen und reichlich pigmenttragende Histiocyten. Junges Granulationsgewebe mit Fibroblasten und Fibrocyten umgibt das Transplantat - teilweise nur mit 1-2 Zellschichten - kapselartig. Meist etwas entfernt vom Transplantat finden sich Fremdkörpergranulome mit Fremdkörperriesenzellen. Das Muttergewebe zeigt um das Transplantat viele gut gefüllte Blutgefäße, um die manchmal die entzündlichen Infiltrate deutlicher hervortreten. (Abbildung 3 - 5).

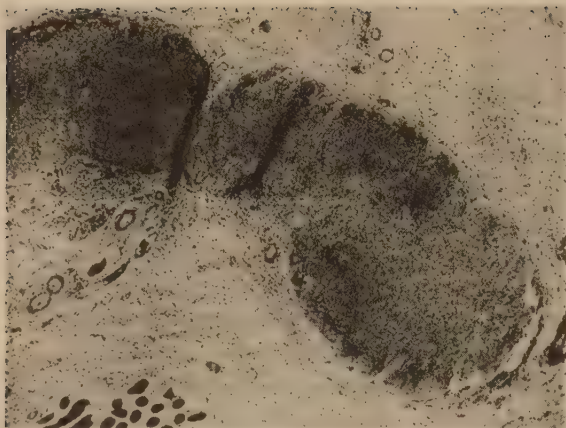


Abb. 3. Serie B, 1 Woche (1:50):

2 Milzscheibchen. Erythrocyten nur in der Peripherie. Verbreiterte Milzkapsel. Mäßige Rundzelleninfiltration des angrenzenden Muttergewebes mit vereinzelt Fremdkörperriesenzellen.



Abb. 4. Serie B, 1 Woche (1:310):

Ausschnitt aus Abb. 3. Fast nur mit Erythrocyten gefüllte Randsinus. Deutliche Abnahme der Füllung zum Zentrum (oben) hin. Verbreiterte Milzkapsel. Rundzelleninfiltrate (Lymphocyten, Plasmazellen, Makrophagen) und Pigment in der Umgebung.

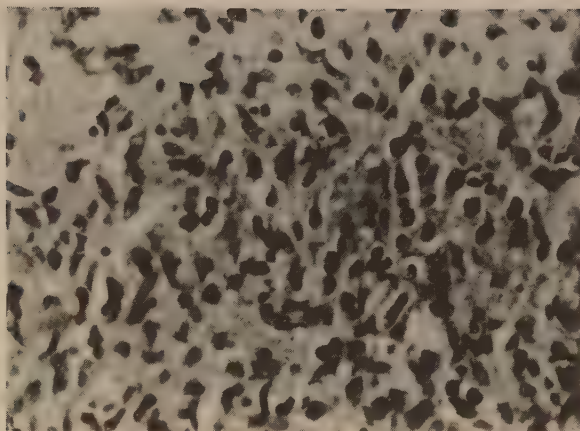


Abb. 5. Serie B, 1 Woche (1:680):

Ausschnitt aus dem Zentrum von Abb. 3. Kollabierte Sinus. Fibrosiertes und hyalinisiertes Grundgerüst. Turgorarme teilweise Fibrocytenähnliche Reticulumzellen.

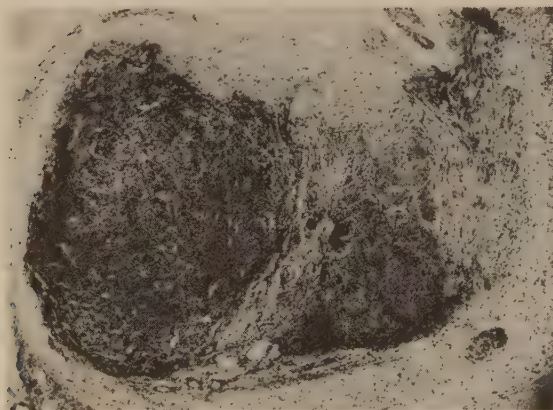


Abb. 6. Serie A, 2 Wochen (1:60):

Sinusoide im Zentrum mit Erythrocyten gefüllt. Zwischen den Milzscheibchen einsprossendes Bindegewebe mit Fremdkörpergranulomen.

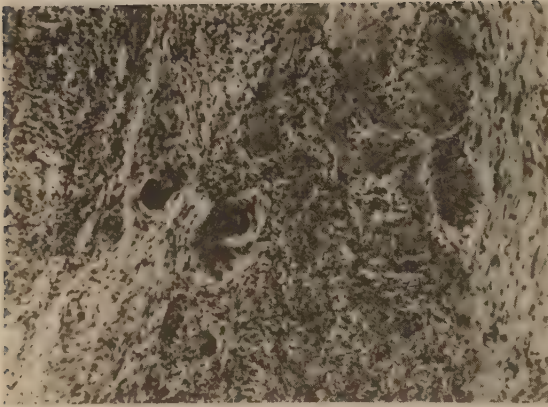


Abb. 7. Serie A, 2 Wochen (1:160):

Ausschnitt aus Abb. 6. Einsprossendes Bindegewebe mit Fremdkörpergranulomen. Rechts und links regenerierendes Milzgewebe.

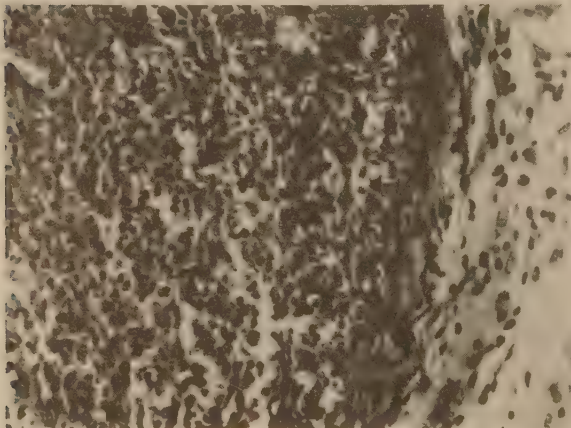


Abb. 8. Serie A, 2 Wochen (1:420):

Ausschnitt aus Abb. 6. Deutlich bessere Füllung der Sinus mit Erythrocyten im Vergleich zu Abb. 4. Gleichzeitig Beispiel für eine neugebildete Kapsel vom Muttergewebe.

Nach 2 Wochen ist die Schrumpfung des Gewebes weiter vorgeschritten. Die hyalin-verquollene Milzkapsel wird völlig von einem zellreichen aus Fibroblasten und Fibrocyten bestehenden Bindegewebe umgeben. Stellenweise wird die Kapsel durchdrungen und man hat den Eindruck, daß das Bindegewebe teilweise in das Milztransplantat einsproßt (Abbildung 6). Das Lymphgewebe ist weiterhin spärlich, jedoch deutlich besser ausgebildet, als nach 1 Woche Transplantationszeit. Man findet gelegentlich in der Peripherie des Transplantates knötchenartige Lymphocytenansammlungen. Die Sinus sind weit, prall mit Erythrocyten gefüllt, auch im Zentrum des Transplantates (Abbildung 8). Das reticuläre Gewebe tritt zurück, die Reticulumzellen sind klein. Die Umgebung des Transplantates zeigt eine chronische infiltrative Entzündung. Im umgebenden und einsprossenden Bindegewebe finden sich zahlreiche kleine Fremdkörpergranulome. (Abbildung 7).

Nach 4 Wochen gewinnt das Gewebe histologisch im Überblick milzähnliche Strukturen zurück. Die Schrumpfung des Gewebes ist nicht weiter fortgeschritten. Die Milzkapsel ist dort wo sie erhalten blieb fibrosiert und hyalinisiert. Das Trabekelwerk ist ähnlich verändert. Fehlt beim Transplantat die Milzkapsel, so gewinnt man den Eindruck, als ob vom Muttergewebe ein Kapselersatz aus dem umgebenden Bindegewebe gebildet wird. Selten findet man im Zentrum des Transplantates hyalinisiertes Narbengewebe, das z. T. durch Fettzellen aufgelockert ist. Das Lymphgewebe zeigt eine deutliche Tendenz zur Regeneration und Proliferation. Man sieht im Aufbau befindliche Lymphfollikel - manchmal mit Keimzentren. Die Sinusoide sind prall gefüllt; es finden sich darin auch vereinzelt Lymphocyten. (Abbildung 9).

Die Reticulumzellen gewinnen wieder ihr ursprüngliches Aussehen und zeigen statt des dichten pyknotischen Kernes große hellere Kerne. Die zelligen Infiltrate in der Umgebung nehmen zwar quantitativ ab, bleiben aber in ihrer Zusammensetzung unverändert - eosinophile Zellen, Lymphocyten, Plasmazellen, pigmenttragende Histiocyten und vereinzelte Fremdkörperriesenzellen. Das gelb-braune bis goldgelbe Pigment wird nicht nur innerhalb der Makrophagen, sondern auch extrazellulär in der Umgebung des Transplantates vorgefunden.

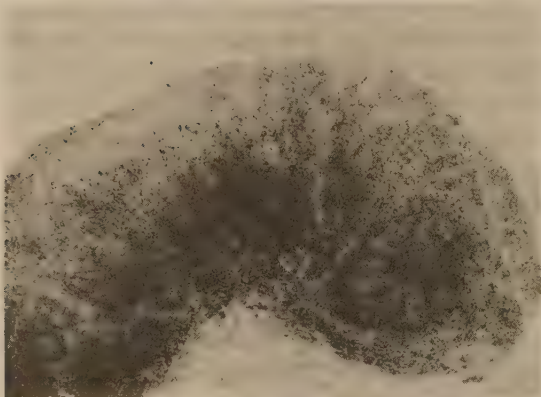


Abb. 9. Serie A, 4 Wochen (1:40):

Übersicht über ein Regenerat. Beginnender Aufbau der Lymphfollikel mit kleinen Keimzentren. Dünne neugebildete Milzkapsel. Geringe Rundzellinfiltration der Umgebung. (Wie in der "Spendermilz" auch hier viel gelb-braunes Pigment im Transplantat.

S e r i e C: (24 h in Macrodex 6% bei $+5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Nach 1 Woche Transplantationszeit ist das verpflanzte Gewebe schwer geschädigt. Die feingewebliche Milzstruktur ist völlig verlorengegangen. In vielen Fällen findet man partielle Nekrosen. Bei einem Tier war ein Scheibchen völlig nekrotisch - es fand sich ein grobmaschiges, netzartiges Gitter ohne einen einzigen Kern - ,während das zweite Scheibchen nur partiell schwer geschädigt war. Die Kapsel ist hyalinisiert und verdickt. Das lymphatische Gewebe ist geschwunden. Innerhalb des Transplantates sieht man kaum einen Lymphocyten. Die Reste der Malpighischen Körperchen sind an dem circulären fibrosierten und hyalinisierten Grundgerüst, das oft die mit einem hyalinen Thrombus verschlossene Zentralarterie umschließt, zu erkennen. Der größte Teil des Transplantates ist in ein aus Fibrocyten-ähnlichen Zellen aufgebautes netzartiges Gewebe umgewandelt, in dessen Maschen körnige, farblose Eiweißmassen und gelb-braunes Pigment neben einigen Reticulumzellen mit bläschenartigem Kern zu finden sind. Regelmäßig sieht man innerhalb und außerhalb des Transplantates aus Riesenzellen aufgebaute Granulome. Diese Riesenzellen umschließen homogene acidophile Massen, die sehr oft durch Vakuolen aufgelockert sind. Sie sind oft um Gefäße herum zu beobachten, deren Lumen mit einer hellen Substanz verschlossen ist. Außerdem scheinen sie gehäuft an den Resten der Malpighischen Körperchen aufzutreten. (Abbildung 10 und 11). An einigen kleinen Stellen des Transplantates sind die Sinusoide erhalten und sind mit Erythrocyten gefüllt. Auch an diesen Stellen sind die Reticulumzellen verändert und wirken fibrocytenähnlich. Das zellreiche junge Granulationsgewebe des Muttergewebes umschließt das Transplantat und sproßt oft in das verpflanzte Gewebe ein.

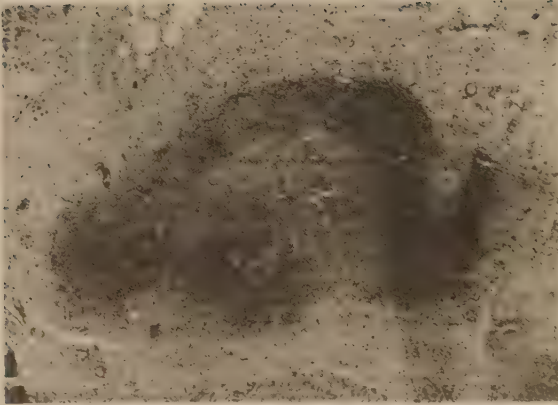


Abb. 10. Serie C, 1 Woche (1:125)

Nur wenig periphere Sinus mit Erythrocyten gefüllt. (bei 2 und 8 Uhr). Stark geschrumpftes Transplantat. Viele Riesenzellgranulome innerhalb des Transplantates, bevorzugt um mit einer hellen Substanz verschlossene Gefäße. Erhebliche zellulär-proliferative Entzündungsreaktion des Muttergewebes.

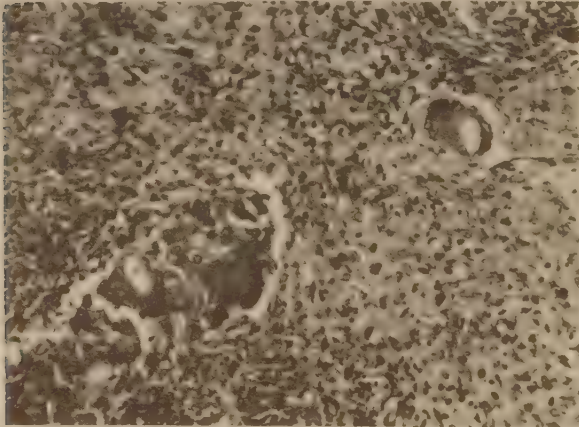


Abb. 11. Serie C, 1 Woche (1:310)

Ausschnitt aus Abb. 10. Fremdkörperriesenzellgranulome. Bläschenartige, epitheloidzellartige Reticulumzellen.

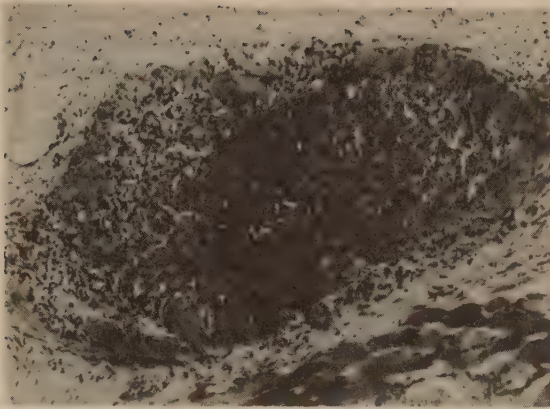


Abb. 12. Serie C, 4 Wochen (1:160)

Überblick über ein sehr kleines Regenerat mit milztypischer Feinstruktur. Hyalinisierte und verdickte Milzkapsel. Geringe chronisch proliferative Entzündung des Mutterbodens.

Die Zellen der chronischen infiltrativen Entzündung sind zu finden; ebenso sieht man immer gelbbraunes Pigment außerhalb und innerhalb der pigmenttragenden histiocytären Zellen.

Nach 2 Wochen ist das Gewebe erheblich geschrumpft. Blickfang im histologischen Präparat ist die in Relation zum vorhandenen Gewebe erheblich verdickte - meist wellig oder gefaltet aussehende - Milzkapsel. Weiterhin fallen die Riesenzellen innerhalb und außerhalb des Transplantates auf, die z. T. kleine Granulome bilden. Es findet sich kein lymphatisches Gewebe. Einige Sinusoide sind mit Erythrocyten gefüllt. Die Umgebung des Transplantates erscheint etwas zellärmer als nach 1 Woche. Gelb-braunes Pigment und die rundzellige Infiltration findet sich in der Umgebung.

Nach 4 Wochen ist das geschädigte Gewebe vom Muttergewebe aus organisiert; oft findet man vom Trans-

plantat nur noch ein kollagenes kernarmes Band - als Rest der Milzkapsel. Die kleinen erhaltenen Gewebsbezirke zeigen Zeichen der Regeneration. Die Sinusoide sind mit Erythrocyten gefüllt. Reticulumzellen sind zahlreich in ihrer gewohnten Form anzutreffen. Man findet wieder lymphatisches Gewebe, bei einem Präparat sieht man einen sich aufbauenden Lymphfollikel. In der Umgebung des Transplantates ist das Bindegewebe nicht mehr so zellreich; die rundzellige Infiltration ist nicht ausgeprägt. (Abbildung 12). Kleine Riesenzellgranulome sind ebenso wie das gelb-braune Pigment und die Pigmentmakrophagen vorhanden.

S e r i e D: (24 h in Macrodex 6% bei $-13^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$)
Nach 1 Woche findet man vom Transplantat nur nekro-
 tisches-nekrobiotisches Material. Die Zellen sind
 dissoziiert, man sieht blaß-rote protoplasmatische
 Klümpchen. Die Kerne sind an Zahl stark vermindert,
 sie sehen stark pyknotisch oder karyorhektisch aus.
 Man findet Chromatinklümpchen. Im Zentrum des Trans-
 plantates findet man homogene acidophile Massen, die
 von einer Kerntümmerzone und Leukocyten umgeben
 sind. Diese Gebiete nekrotischen Materials sind von
 einem gefäß- und zellreichen Granulationsgewebe um-
 geben; man sieht Fibroblasten, Fibrocyten, Plasma-
 zellen, Lymphocyten und histiocytäre Zellelemente,
 die manchmal Epitheloidzell-ähnliche Formen anneh-
 men. Eine klare Grenze zwischen dem Bindegewebe des
 Mutterbodens und dem Transplantat besteht oft nicht.
 (Abbildung 13).

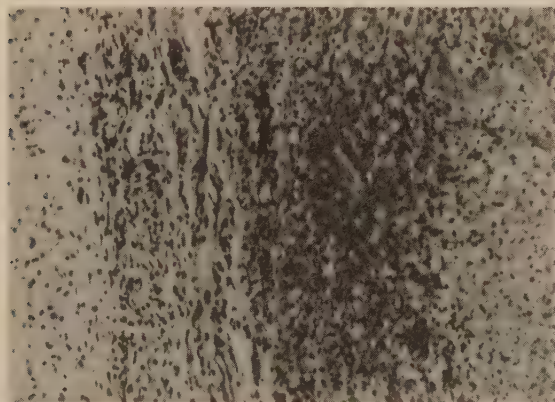


Abb. 13. Serie D, 1 Woche (1:160)

Fließender Übergang vom stark zellulär infiltrier-
 ten Granulationsgewebe des Mutterbodens zum Trans-
 plantat. Zelldissoziation, Kernpyknose, Karyorhexis
 oder Karyolyse im Transplantat.

Nach 2 Wochen beherrschen die Zeichen der chronisch proliferativen Entzündung das Bild. Mikroabzeßartig werden homogene stark acidophile Massen mit randständiger Kerntrümmerzone von einem zell- und faserreichen Granulationsgewebe umschlossen. Speicherzellen, teils Schaumzellenartig, sind zu finden. Ein exakter Übergang zwischen dem Bindegewebe des Mutterbodens und dem reticulo-histiocytären Gewebe im Transplantatbereich läßt sich nicht angeben. Plasmazellen und Lymphocyten sind reichlich in der Umgebung des Transplantates, man sieht sie aber auch im Transplantatbereich. (Abbildung 14 und 15). An einigen kleinen Stellen ist das Transplantat in ein aus wenigen fibrocytenähnlichen Zellen aufgebautes, kollagenisiertes und fibrosiertes netzartiges Gewebe umgewandelt, in dessen Maschen neben fibrinoiden Substanzen einige Rundzellen liegen.

Nach 4 Wochen bestimmen die homogenen acidophilen Substanzen, die abzeßartig vom Kerntrümmer- und Leukocytenaum und von Bindegewebe umgeben werden, das Bild. Das Resorptionsgewebe des Mutterbodens ist quantitativ deutlich weniger geworden; es ist zellärmer und wirkt faserreicher. Im Transplantationsbereich fällt auf, daß das Gewebe mehr einen reticulo-histiocytären Aufbau hat und die Verfestigung des übrigen Bindegewebes nicht zu beobachten ist; diese Bezirke sind allerdings sehr umschrieben. In der Umgebung des Transplantationsortes sind die Rundzellen nur noch spärlich zu finden. Leukocyten findet man nicht. Mehrere kleine Fremdkörpergranulome fallen auf.

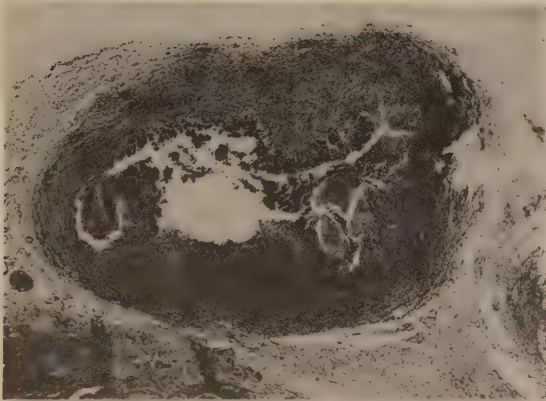


Abb. 14: Serie D, 2 Wochen (1:40)

Fast völlige Nekrose des Transplantates; homogene acidophile Massen -"mikroabszeßartig"- im Zentrum. Starke entzündlich-proliferative Reaktion des Muttergewebes.



Abb. 15. Serie D, 2 Wochen (1:310)

Ausschnitt aus Abb. 14. "Mikroabszeß".

Ein Präparat stimmt mit den eben beschriebenen histologischen Gegebenheiten nicht überein. (Abbildung 16 und 17). Man sieht keinen Mikroabszeß, sondern ein reticulo-histiocytäres Gewebe, das am Rande von lymphatischem Gewebe umsäumt wird. Fibrinoide schwach eosinophile Substanzen sind zwischen den Zellen zu sehen. Die hyalin-verdickte Milzkapsel umgibt auf der einen Hälfte das Transplantat. Das vom Mutterboden gebildete Bindegewebe ist nicht sehr dicht, recht wenig und nicht stark zellig infiltriert. An der der Milzkapsel abgewandten Seite findet ein fließender Übergang der Lymphocyten, die sich im Transplantat angesiedelt haben, in das umgebende Bindegewebe statt. Einige Fremdkörpergranulome und wenige Pigmentmakrophagen sind zu sehen.

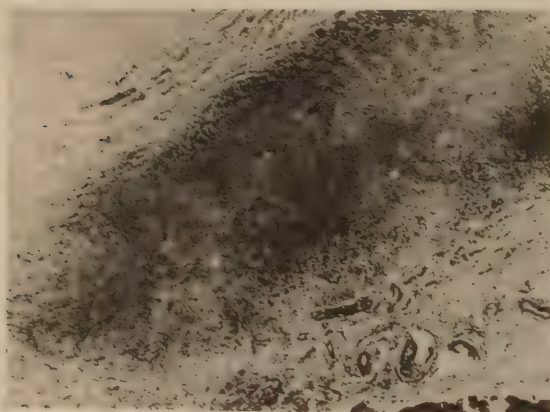


Abb. 16. Serie D, 4 Wochen (1:50)

Lympho-reticuläres Gewebe umgeben von lockerem mäßig mit Rundzellen infiltriertem Bindegewebe. Hyalin verdickte Milzkapsel bildet auf der rechten Seite (3 nach 6 Uhr) die Begrenzung; auf der anderen Seite kontinuierlicher Übergang der Lymphocyten vom Transplantat in das umgebende Bindegewebe.



Abb. 17. Serie D, 4 Wochen (1:160)

Ausschnitt aus Abb. 16. Lympho-reticuläres Gewebe. Helle Reticulumzellen. Sinusoide nicht sicher erkennbar. Schwach eosinophile, gekörnte Substanzen zwischen den Zellen.

Serie E: (1 Wo. in Macroder 6% bei $-13^{\circ} + 3^{\circ}\text{C}$)
Nach 1 Tag Transplantationszeit zeigt ein Präparat die völlige Nekrose des transplantierten Milzscheibchens (Abbildung 18). Die Milzkapsel, das Trabekelwerk und das feine kollagene Gittergerüst, in dessen Maschen gleichermaßen eosinanfärbbare protoplasmatische Klümpchen liegen, sind fibrinoid verquollen. Intakte Zellkerne sind nicht auffindbar. Die Karyorhexis überwiegt die Karyolyse; im Zentrum des Transplantates sieht man Chromatinbröckel. Die unmittelbare Umgebung des Transplantates ist nicht gut zu beurteilen; die einzigen zu sehenden Zellen sind Leukocyten.



Abb. 18. Serie E, 1 Tag (1:160)

Nekrose des Transplantates. Acidophile protoplasmatische Klümpchen; Karyorhexis, Chromatinbröckel, Karyolyse. Fibrinoid verquollenes Grundgerüst und Trabekel.

Nach 1 Woche sieht man im Bereich des verpflanzten Gewebes ein gefäß- und zellreiches Granulationsgewebe, in dem stellenweise Massierungen von intakten und zerfallenden Leukocyten mit Fibrinablagerungen zu sehen sind. Um die homogene acidophile Substanz ist der Leukocytensaum und die Kerntrümmerzone

stark ausgeprägt. Der Übergang des stark mit Rundzellen infiltrierten Bindegewebes zum Transplantat ist fließend. Man hat den Eindruck, daß im Transplantat ein sehr kernarmes mit fibrinoider Substanz gefülltes Gitter verblieb, das mit Rundzellen erheblich infiltriert ist.

Nach 2 Wochen sieht man zwei Möglichkeiten des Transplantatschicksals. Einerseits wird das Gewebe von einem zell- und faserreichen Granulationsgewebe organisiert. Man sieht die kleinen abszeßartigen Gebilde mit Kerentrümmersaum und Fibrin im angrenzenden Bindegewebe. Die Infiltration mit Rundzellen ist zu beobachten. Man sieht kleine Fremdkörpergranulome. Andererseits sieht man an zwei Beispielen wie das verpflanzte Gewebe in ein hyalinisiertes Narbengewebe umgewandelt wird (Abbildung 19). In weiten Abständen findet man fibrocytenähnliche Kerne über das Transplantat verstreut. Es sind sehr wenig kleine Rundzellen im Transplantat. Die Umgebung ist reizlos, es hat sich sehr wenig Bindegewebe ohne nennenswerte chronisch entzündliche Infiltrate gebildet.

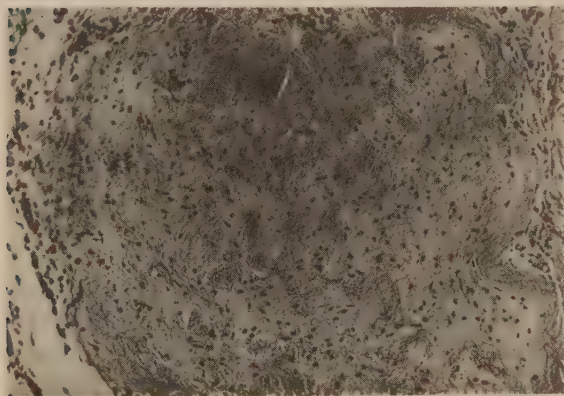


Abb. 19. Serie E, 2 Wochen (1:160)
Hyaline Narbe als Transplantatrest.

Nach 4 Wochen tritt das Granulationsgewebe um das Transplantat herum nicht mehr so deutlich hervor. Das Zentrum des Transplantates wird von einer homogenen stark acidophilen Substanz mit einem schmalen Leukocyten- und Kerentrümmersaum eingenommen. Ein recht weitmaschiges reticulo-histiocytäres Gewebe nimmt die Randpartien ein. In seinen Maschen finden sich fibrinoide Substanzen und in unterschiedlicher Betonung Rundzelleninfiltrate. Manchmal sieht man Speicherzellen. In der Umgebung findet man kleine Fremdkörpergranulome. Nach wenigen Zellschichten geht das Bindegewebe des Mutterbodens in Fettgewebe über.

S e r i e F: (24 h in Rheomacrodex 10% bei $-13^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$)

Diese Serie gleicht in den Ergebnissen der Verlaufsbeobachtung des verpflanzten Gewebes der Serie E.

S e r i e G: (24 h in 0,9% NaCl bei $+5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Diese Serie gleicht in den Ergebnissen im Prinzip der Serie C. Nach 1 Woche sieht man öfter das verpflanzte Gewebe am Rande von kleinen Hämatomen.

Nach 2 Wochen erscheint das Granulationsgewebe stark entzündlich infiltriert. Man sieht reichlich Leukozyten neben Plasmazellen, Lymphocyten und Eosinophilen. Kleine Abszeße mit Kerentrümmerzone und deutlichem Leukocytenaum fallen auf. Nach 4 Wochen ist die Regenerationstendenz des erhaltengebliebenen Milzgewebes unverkennbar. Reticulumzellen sind in ihrer gewohnten Form zu sehen, Sinusoide sind mit Erythrocyten durchströmt und am Rande des quantitativ stark reduzierten Gewebes sieht man lymphatisches Gewebe; sehr viel hämosiderinartiges Pigment in der Umgebung.

S e r i e H und I: (2 h in Rheomacrodex 10% bzw. 0,9% NaCl bei 22°C)

Diese beiden Serien gleichen im Prinzip der Serie B. Zu Beginn der Beobachtungszeit fallen öfter kleine Hämatome in unmittelbarer Nachbarschaft der Transplantate auf. Am Ende der Beobachtungszeit sieht man sehr viel hämosiderinartiges Pigment und Pigmentmakrophagen in der Umgebung des verpflanzten Gewebes.

S e r i e n J-O: ("deep-freezing": 1 h bei -76°C in verschiedenen Medien - s. Tabellen 1, 3 und 4)

Nach 1 Woche Transplantationszeit sieht man bei einem Teil der Präparate als Transplantatrest die fibrinoid verquollenen kollagenen Strukturen - Milzkapsel, Trabekel und kollagenes Grundgerüst - des verpflanzten Gewebes. Man sieht keine Zellen im Transplantat; dadurch tritt das lockere, weitmaschige, zarte kollagene Grundgerüst deutlich hervor. Die

Maschen sind mit fibrin- oder eiweißartigen Substanzen gefüllt. Über das Transplantat verstreut findet man einige Zellkerne, die sehr unterschiedlich aussehen; manche sind hochgradig pyknotisch und dunkel gefärbt, andere ähneln Fibrocyten und wieder andere gleichen funktionsfähigen Reticulumzellkernen. Daneben sieht man bei einigen Präparaten an einer Stelle massiert Chromatinbröckel oder in kleinen Gruppen Reticulumzellkerne, die der Karyolyse anheimzufallen scheinen. In der Umgebung sieht man ein zell- und kapillarreiches Granulationsgewebe mit relativ wenigen Rundzellen. Um die hyalinisierte Milzkapsel legt sich das Bindegewebe des Mutterbodens mit einigen flachen Zellschichten kapselartig herum.

Bei dem anderen Teil der Präparate sieht man nach 1 Woche eine völlige Nekrose des verpflanzten Gewebes (Abbildung 20). Im Zentrum des Transplantates ist keinerlei Struktur zu erkennen; nur gelegentlich findet man Milzkapselreste, deren Kollagen aufgequollen und fragmentiert erscheint. Am Rande der strukturlosen acidophilen Substanz sieht man Zellkernreste, die entweder karyolytisch verdämmern oder dessen Chromatinbröckel sich mit der Kerntrümmer- und Leukocytenzone, die diese nekrotischen Massen umgeben, vermengen. Das Bindegewebe der Umgebung ist sehr stark entwickelt; es ist sehr zell- und gefäßreich. In der weiteren Umgebung sieht man neugebildete kollagene Fasern. Es entsteht so der vollständige Eindruck eines Abszeßes, in dem das Transplantat zu Grunde geht.

Nach 2 Wochen ist das verpflanzte Gewebe in ein lockeres aus kollagenen Fäserchen netzartig aufgebautes Gewebe umgewandelt, in dem man nicht mehr viele fibrocytenähnliche Zellkerne sieht. (Abbildung 22). Bei den meisten Präparaten haben sich Fettzellen ausgebildet, die das Transplantat durchsetzen.

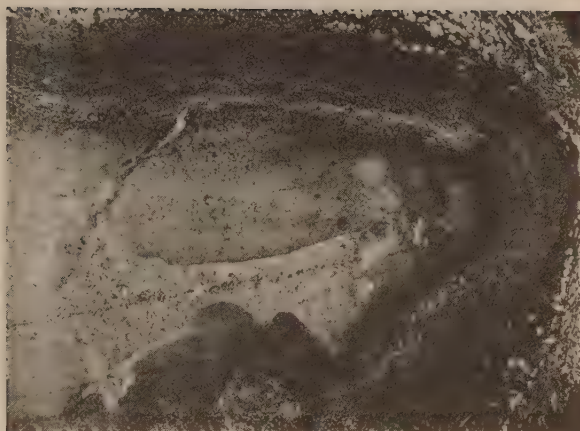


Abb. 20. "deep-freezing." 1 Woche (1:100)

Abszeßartiger Untergang des verpflanzten Gewebes. Kerntrümmer- und Leukocytenaum. Milzkapselreste quer im Bild und bei 6 Uhr erkennbar.

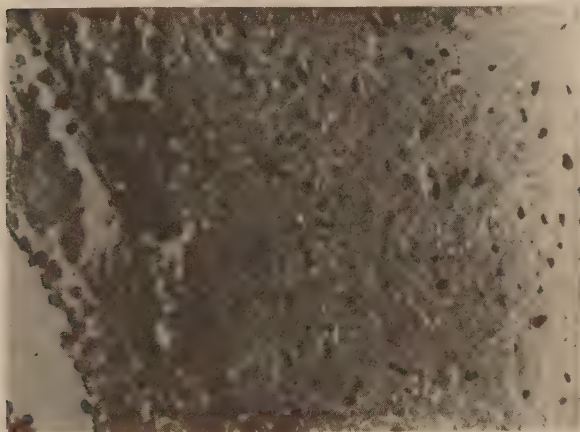


Abb. 21. "deep-freezing.", 1 Woche (1:420)

Dreiviertel rechts im Bild das Transplantat: Nekrose, Zelldissoziation, protoplasmatische Klümpchen. Wenige pyknotische Kerne. Karyorhexis und Karyolyse. Das fibrinoid verquollene Grundgerüst wird erkennbar.

Man sieht einige Pigmentkörnchen im Transplantat. Die Umgebung wird von einem unauffälligen Bindegewebe gebildet. In zwei Präparaten sieht man nach 2 Wochen in dem kollagenen Grundgerüst des Transplantates ein zellreiches reticulo-histiocytäres Gewebe. Zwischen z. T. hellen bläschenförmigen Zellkernen liegen dicht dunkle Lymphocyten und Plasmazellen. An einigen umschriebenen Stellen sieht man Kerntrümmer. Einige Riesenzellen - überwiegend um hyalin-thrombosierte Gefäße - fallen im Transplantat auf. Es finden sich auch mit Erythrocyten gefüllte Gefäße. Das Bindegewebe des Mutterbodens ist um das Transplantat zell- und faserreich. Zahlreiche Kapillaren sproßen in das Transplantatgebiet ein. Ein exakter Übergang zwischen dem Gewebe im Transplantat und dem umgebenden Bindegewebe ist (in den stärkeren Vergrößerungen) oft nicht anzugeben. Nach 4 Wochen ist in fast allen Präparaten ein Narbenstadium erreicht oder abzusehen. Die kernlosen hyalinisierten Milzkapsel- und Trabekelreste, an die sich wenige langgestreckte Fibrocyten ähnliche Kerne lagern, sind oft die einzigen Überbleibsel des Transplantates. Das vorher beschriebene aus kollagenen Fasern aufgebaute netzartige Gewebe ist zum größten Teil durch große runde Fettgewebszellen ersetzt (Abbildung 23). Einige Pigmentkörnchen findet man im Transplantationsgebiet. Das umgebende Bindegewebe ist deutlich kernärmer und faserreicher geworden.

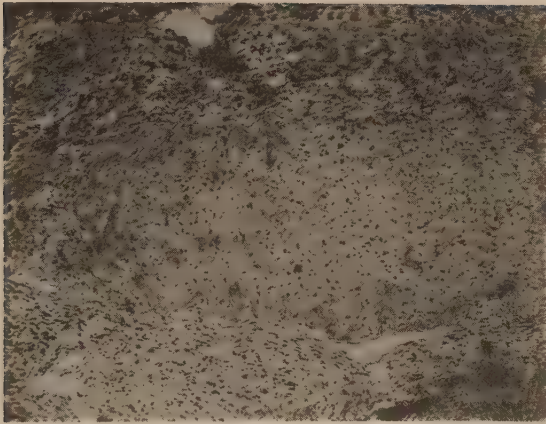


Abb. 22. "deep-freezing", 2 Wochen (1:100)

Hyalinisiertes, vernarbendes Transplantat. Gefäß-
anschluß (bei 11 Uhr). Im Zentrum relativ lockere
Struktur (Fetteinlagerung?)

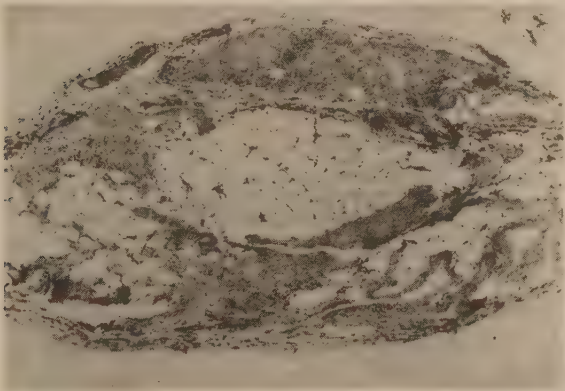


Abb. 23. "deep-freezing", 4 Wochen (1:60)

Weitgehender Ersatz des Transplantates durch Fett-
gewebe. Hyalinisierte und verdickte Milzkapsel
(knäuelartig oben im Bild und wie ein geschlungenes
Band rechts unten) als Transplantatrest.

DISKUSSION

Vorversuch

Der Vorversuch sollte die Frage beantworten lassen, ob es durch Transplantation mehrerer dünner Milzscheibchen möglich ist, an heterotoper Stelle ein funktionsfähiges "Organ" aufzubauen. E. KNAKE hat in vielen Arbeiten immer wieder den Vorteil dieser Methode betont. Für Schilddrüsengewebe hält sie die Scheibchentransplantation für die Methode der Wahl. Einen Beweis, daß das verpflanzte Gewebe nicht nur nach histomorphologischen Kriterien intakt, sondern auch funktionell vollwertig ist, hat sie nicht erbracht.

Für das Milzorgan ist in der Milzscintigraphie mit Cr⁵¹-markierten und hitzealterierten Erythrocyten eine gute Möglichkeit gegeben, einen Teil ihrer Funktion zu überprüfen; diese Methode stützt sich auf die normalerweise vorwiegend in der Milz stattfindenden Elimination gealterter Erythrocyten (Sphaerocyten). In unserer Versuchsanordnung ist es uns nicht gelungen, durch Injektion hitzealterierter und mit Cr⁵¹-markierter Erythrocyten einen Aktivitätsunterschied über dem verpflanzten Gewebe zur Umgebung mit dem Scintigraphen festzustellen, oder autoradiographisch die Funktion der "Rucksackmilz" nachzuweisen, obwohl histologisch milztypisches Gewebe gefunden wurde (Abbildung 1).

Mehrere Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: Die positiven Resultate der Milzscintigraphie sind an die intakte histologische Struktur der Milz gebunden. Narbengewebe kann ebenso wie die Proliferation lymphatischen Gewebes (z. B. Morbus Hodgkin) oder ortsfremder Zellen die milztypische Sequestration der Sphaerocyten herabsetzen (DUESBERG und FISCHER).

In unseren histologischen Präparaten sind die unterschiedlich großen Konglomerate von Milzgewebe aus mehreren einzelnen Milzscheibchen, die von bindegewebigen Strängen-Septen ähnlich - umgeben sind, aufgebaut. Außerdem sind diese Konglomerate (meist 2-3) über einen gewissen Raum verstreut. In der Isotopendiagnostik - vor allem in der Leber-scintigraphie - ist der "Dünnschichteffekt" von randständigen Speicherdefekten differentialdiagnostisch abzugrenzen (HOPPE). Diese Deutungsmöglichkeit käme bei der Streuung des zusätzlich quantitativ deutlich verminderten Gewebes ebenfalls in Betracht. Das Kaliber der Blutgefäße, die zu dem verpflanzten Gewebe ziehen, ist kleiner als bei der Milz in situ. Es wäre zu überlegen, ob hämodynamische Gegebenheiten in Kombination mit den schon angeführten Faktoren - vor allem relativ wenig und verstreut liegendes Gewebe - die positiven Ergebnisse der Scintigraphie verhindern. Die rasche Anflutung der markierten Erythrocyten in der Scintigraphie beim Menschen schafft einen deutlichen Aktivitätsunterschied zur Umgebung. Es wäre denkbar, daß in unseren Versuchen mit aus den genannten Gründen kein deutlicher Aktivitätsgradient zur Umgebung entsteht.

Bevor man diskutiert, ob das negative Ergebnis des Autoradiographieversuches eine Diskrepanz zwischen Morphologie und Funktion des verpflanzten Milzgewebes nahelegt oder nicht, sind methodische Mängel zu berücksichtigen. Sie dürften bei unserer Versuchsanordnung mit für den Ausgang des Autoradiographieversuches verantwortlich machen zu sein. Die Befestigung des Filmes müßte wesentlich verbessert werden; 7 Tiere verstanden es, den Leukoplastverband zu lockern und den Film anzuknabbern. Man müßte für diesen Zweck kleine Spezial-Kassetten konstruieren, die man mit entsprechenden Ösen direkt auf den Rücken der Tiere annähen können müßte.

Unabhängig von den methodisch-technischen Problemen, bleibt weiterhin die Frage offen, ob die Scintigraphie mit Cr₅₁-markierten Erythrocyten bei dem relativ wenigen - teils verstreut liegend, teils durch Bindegewebssepten gegliedert - Milzgewebe eine genügend empfindliche und erfolgversprechende Funktionsprüfung bietet.

Abgesehen von dem Ergebnis des Autoradiographieversuches - der auch nur über eine Teilfunktion des verpflanzten Gewebes eine Aussage erlaubte - ist der Nachweis, daß ein Versuchstier ohne das entsprechende Organ nicht lebensfähig ist, der beste Beweis für die Organfunktion. Es ist in diesem Zusammenhang von Vorteil, daß die Milz bei Bartonellen infizierten Ratten ein lebenswichtiges Organ ist. LAUDA zeigte 1925 erstmalig, daß die Splenektomie bei Ratten zu einer schweren, oft tödlichen Anämie führt. Haemobartonella muris Mayer (Bart. muris rattii) ist nach elektronenoptischen Untersuchungen von WIGAND und PETERS ein 0,3 - 0,5 μ großer kugliger Erreger, der sich an die Erythrocyten (mit Vorliebe in der konkaven Mitte) - durch verschiedenartige Aneinanderlagerung der einzelnen Erreger T-, hantel- oder stäbchenförmig - heftet. (zit. n. SCHERMER). Wir waren uns zuvor nicht sicher, ob unsere Laborratten latent mit Bartonellen infiziert sind, obwohl man nach SCHERMER mit einer fast 100%-igen Verseuchung aller Ratten rechnen muß. Die Ergebnisse der Serie B nach Splenektomie beweisen, daß die hier verwandten Tiere mit Bartonellen infiziert sind. 60% der Tiere sterben mit den in der Literatur beschriebenen klinischen Zeichen bei der Bartonellenanämie; bei 13 der 18 Tiere wurden im Blutaussstrich der Erythrocytenbefall mit Bartonellen gesehen.

In den hier angeführten Versuchen muß also die Tatsache, daß alle Tiere der Serie A die Extirpation der abdominellen Restmilz überlebten, als eindeutiger Beweis für die Funktion des auf den Rücken verpflanzten Milzgewebes angesehen werden. Nach SCOTT und STANNARD kann durch eine Röntgenbestrahlung oder durch eine Behandlung mit radioaktivem Polonium eine Bartonellenanämie manifest werden. Bei der Serie A starben nach der Injektion von Cr₅₁-markierten Erythrocyten 8 von 15 Ratten. Nach dem klinischen Bild nehmen wir als Todesursache die Bartonellenanämie an, obwohl wir von diesen Tieren keine Blutausstriche haben. Bei der histologischen Untersuchung fanden sich bei diesen Tieren öfters akute Schäden des Milzgewebes. Es liegt nahe, dies als Schädigung durch die radioaktive Substanz zu deuten. Die klinischen Zeichen vor dem Tod würden an Bedeutung gewinnen. Die Möglichkeit, das qualitativ intakte - jedoch quantitativ reduzierte - Milzgewebe durch Cr₅₁ zu schädigen und dadurch eine Bartonelleninfektion manifest werden zu lassen, halten wir für gegeben. Zur endgültigen Beurteilung fehlt aber z. B. eine Vergleichserie an 4/5-milzresizierten Ratten und entsprechender Injektion von Cr₅₁.

Abschließend können wir zu den Ergebnissen des Vorversuches feststellen, daß die Transplantation von 12-15 dünnen Milzscheibchen auf die Rückenmuskulatur eine geeignete Methode darstellt, um funktionsfähiges Gewebe zu erhalten. Die "Rucksackmilz" vermag bartonelleninfizierte Ratten vor der tödlichen Anämie nach der Exstirpation der abdominellen Restmilz zu bewahren. Wir schließen daraus, daß für dieses Gewebe die Scheibchentransplantation eine geeignete Grundlage bietet, um die Vitalität von konserviertem Milzgewebe abschätzen zu können.

Hauptversuch

Die makroskopischen Befunde bei den einzelnen Serien des Hauptversuches lassen sich mit den histologischen Präparaten gut korrelieren. Hatte man bei der Autopsie milzfarbenes Gewebe gefunden, so wurde man im allgemeinen durch die Histologie bestätigt. Zweimal sind wir allerdings durch kleine Hämatome, die in Farbe und Form dem sonst vorgefundenen Milzgewebe völlig glichen, getäuscht worden (Serie G und I). In den Serien D - F hatte man in 3/4 der Fälle nicht mit Sicherheit das Transplantat identifiziert. Histologisch war das Transplantat in fast allen Fällen im Schnitt getroffen. Die Kleinheit des Transplantatrestes und die regressiven Veränderungen erklären den makroskopischen Befund. Beim rein-makroskopischen Vorgehen der Auswertung solcher Versuche bestünde also die Gefahr der falsch positiven Ergebnisse.

Besprechung der histologischen Befunde der Serien A, B, H und I.

Wurde Milzgewebe in dünnen Scheiben 1 oder 2 Stunden bei Zimmertemperatur in Macrodex oder Rheomacrodex oder physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt, so konnte man nach anfänglicher Regression eine gute Erholung des Gewebes beobachten. Das Stadium der Regression - Verlust der milztypischen Struktur, Verlust des lymphatischen Gewebes, Kollaps der Sinusoide mit partieller, randständiger Durchströmung mit Erythrocyten, Fibrocyten ähnliche Gestalt der Reticulumzellen - war nach 2 Wochen überwunden. Nach 4 Wochen war die milztypische feingewebliche Struktur immer hergestellt. Wenn man die Befunde von E. KNAKE (1952) bei der Transplantation von Milzscheibchen auf Mesotestes der Ratte - auch bei entsprechender Würdigung des unterschiedlichen Transplantationsortes - mitberücksichtigt, sind die

regressiven Veränderungen, die wir am deutlichsten nach 1 Woche beobachteten, nicht mit dem Transplantationsmodus erklärbar. Sie sind Folge der Ischaemiezeit; ein erkennbarer Unterschied in der Auswirkung besteht bei 1- oder 2-stündiger Ischaemiezeit nicht. E. KNAKE beschreibt in einer Arbeit 1955, bei der auto-, homo- und heterologe Transplantation von Milzgewebe vergleichend gegenübergestellt werden, eine Zone lymphatischer Zellen im angrenzenden Wirtsgewebe um das Transplantat herum. Man soll diesen lockeren lymphatischen Saum bis 14 Tage nach der Transplantation - unabhängig ob auto- oder homolog - sehen können. Sie erblickt darin transplantateigene emigrierte Zellen und führt als Erklärung den hohen Sauerstoffbedarf und die amöboide Beweglichkeit der Lymphocyten an. Wir sahen bei unseren Präparaten den völligen Schwund lymphatischer Zellen aus dem Transplantat. Diesen Saum lymphatischer Zellen um das Transplantat herum sahen wir selten, und konnten uns dann nicht entschließen, ihn eindeutig von den Rundzellinfiltraten des Mutterbodens zu trennen. 1952 beschrieb KNAKE bei autologen Milztransplantaten nach längerer Beobachtungszeit einen verstärkten Aufbau lymphatischen Gewebes am Rande des Transplantates im Muttergewebe. Sie berichtet von Malpighischen körperchenähnlichen Gebilden, die bevorzugt an Milzkapseldefekten auftreten und nennt sie "Lymphhernien". Diesen Aufbau lymphatischen Gewebes haben wir nach 4 Wochen oft beobachtet. Man gewinnt an unseren Präparaten den Eindruck, daß diese Ansiedlung lymphatischer Zellen von einer reichlichen Blutversorgung und eventuell von der Beschaffenheit des umgebenden Bindegewebes (im lockeren Fettgewebe sahen wir es öfter) induziert wird. Ob es sich bei diesen lymphatischen Zellen um Zellen handelt, die vom Transplantat gebildet worden sind, oder ob das Transplantat induktiv wirkt

und das lymphatische Gewebe vom Mutterboden gebildet wird, läßt sich nicht entscheiden. Nach MASSHOFF möchten wir deshalb statt des Begriffes Regeneration, der nur eine Deutungsmöglichkeit offenläßt, den Begriff Repopulation bei schwierig zu interpretierenden histologischen Bildern verwenden.

Bei unseren Präparaten sieht man keinen wesentlichen Unterschied bei der Verwendung der verschiedenen Medien. Das Auftreten von kleinen Hämatomen bei den Serien mit Rheomacrodex oder physiologischer Kochsalzlösung dürfte wohl durch eine zufällige Verteilung bedingt sein. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß sich im Transplantationsgebiet in 1/3 der Fälle bei der Serie A des Vorversuches nach 2 Tagen ein mächtiges "Serom" entwickelte. Die Punktion und die anschließende mikroskopische Betrachtung des von dem gewonnenen Material angefertigten Ausstriches ergab: massenhaft Erythrocyten, wenig Lymphocyten, keine Granulocyten und einige Reticulumzellen wie man sie von Milzausstrichen her kennt (MOESCHLIN). KNAKE und ENGELBARTH sahen bei den Scheibchentransplantationen von Schilddrüsengewebe auf die Rückenmuskulatur nach kurzen Beobachtungszeiten regellos in das Gewebe ergossene Erythrocyten. Sie erklären das mit der Methode: durch den einseitigen Gefäßanschluß des Scheibchens an den Mutterboden ergießt sich das Blut solange regellos in das Gewebe, bis durch Endothelproliferationen ein geschlossener Kreislauf hergestellt ist. Unsere Befunde über die Zusammensetzung des "Seroms" bei der Punktion der "Rucksackmilz" würden damit in Einklang zu bringen sein. Gleichzeitig könnte man die Genese des gelbbraunen Pigmentes teilweise damit erklären. KNAKE fand die Berliner-Blau-Reaktion des gelb-braunen Pigments am Rande ihrer Milztransplantate nur teilweise positiv.

Besprechung der Serien C und G.

Im Gegensatz zu den Serien, bei denen das Milzgewebe relativ kurz in Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, ist bei den Serien C und G nach einer Aufbewahrungszeit von 24 h im Kühlschrank bei ca. $+5^{\circ}\text{C}$ eine schwere Schädigung des Gewebes zu beobachten. Als Milz nicht mehr erkennbares Gewebe geht nekrotisch zu Grunde und wird von dem Granulationsgewebe des Mutterbodens organisiert und resorbiert. Die resorptiven Vorgänge sind auch innerhalb der erhaltenen Transplantatbezirke an Fremdkörperriesenzellen, die z. T. kleine Granulome bilden und an Speicherzellen abzulesen. Die Erholung der erhaltenen kleinen Transplantatreste erfolgt langsam. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Serien ist nach 2 Wochen die milztypische Struktur noch nicht im Aufbau begriffen. Nach 4 Wochen sind kleine als Milzgewebe erkennbare Regenerate zu finden. Im Unterschied zu den vorigen Serien findet man entsprechend der Nekrosen Narbengewebe im Transplantat. SYMES und RIDDELL berichten, daß bei Milzzellsuspensionen vom Menschen nach einer Aufbewahrung von 24 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ in serumfreien Suspensionsmedien die Fähigkeit zur Zellteilung verloren geht. Versuche der Gewebekonservierung ergeben mit Zellsuspensionen, deren Lebensfähigkeit in Gewebekulturen geprüft wird, oft bessere Ergebnisse als die Autotransplantation (BELTRAN und BLUMENTHAL). Es ist also nicht selbstverständlich, daß in unseren Versuchen einige kleine Teile des verpflanzten Gewebes nach einer Ischaemiezeit von 24 Stunden überlebten.

Besprechung der Serien D - F

In diesen Serien wurde Milzgewebe im Tiefkühlfach eines Kühlschranks bei ca. -13°C eingefroren. Die Befunde variieren - unabhängig von der verwandten Lösung oder Aufbewahrungsdauer - nicht wesentlich, und werden daher gemeinsam besprochen. Bei keinem Präparat sieht man in den angegebenen Zeiträumen organotypische Strukturen. Das verpflanzte Gewebe geht nach einer Aufbewahrungszeit von 1 Tag oder 1 Woche bei ca. -13°C zu Grunde. Dieser Untergang kann anscheinend auf verschiedene Weise geschehen: entweder sehen wir konfluierende nekrotische Massen, die von Granulationsgewebe umgeben sind, so daß das Bild eines Abszeß entsteht, oder man sieht hyalinisiertes und fibrosiertes - zunehmend verödetes - Narbengewebe.

Aus den histologischen Präparaten läßt sich nicht entscheiden, ob diese Vernarbung des Transplantates als "Leistung" des Gewebes selbst anzusehen ist. Es bestünde die Möglichkeit, daß die geschädigten Reticulumzellen kollagene Fasern produzieren, sich in Fibrocyten umwandeln und so die Vernarbung herbeiführen. Ob der allmähliche Zellkernschwund durch Untergang oder Emigration erfolgt, läßt sich nicht entscheiden.

Auf der anderen Seite ist es sehr zweifelhaft - wenn man das Präparat nach 1 Tag Transplantationszeit (Abbildung Nr. 18) betrachtet - ob so ein nekrotisches Gewebe je zu irgendeiner Leistung fähig werden kann. Es wäre dann zu überlegen, ob das hyalinisierte kollagene Grundgerüst des Transplantates von außen her mit den Zellelementen, die man nach 2 oder 4 Wochen findet, bevölkert wird. KNAKE kam nach jahrelangen Experimenten mit der auch hier verwandten Methodik der Transplantation zu der Ansicht, "daß Chromatinbröckel (nach dem gebräuchlichen Terminus karyorhektische Kerne) und wohl sogar ungeformte Chromatintropfen sich unter

entsprechenden äußeren Umständen zu Kernen umformen können." (KNAKE und ENGELBARTH). Wenn diese Ansicht richtig ist, so wäre es möglich, daß selbst ein so nekrotisch-nekrobiotisch aussehendes Gewebe wie in Abbildung Nr. 18 sich soweit erholen könnte, um aus eigener Leistung zu einem allmählich verödenden Narbengewebe werden zu können.

Es ist also die Frage, wie weit durch die Aufbewahrung bei -13°C wirklich das gesamte Gewebe getötet wird, oder ob nicht einige Reticulumzellen diesen Prozeß überstehen können. In der Abbildung Nr. 16 und 17 wird ein Präparat gezeigt, daß diese Problematik eindrücklich demonstriert. Man sieht ein vitales reticulo-histiocytäres Gewebe im Bereich des Transplantates mit vielen lymphatischen Zellen überwiegend randständig. Diese hellen, fast bläschenförmigen oder epitheloidzellähnlichen Zellkerne sieht man auch sonst in diesen Serien, jedoch nur an ganz umschriebenen winzigen Stellen. In dem hier gezeigten Schnitt sieht man sonst keine Nekrose. Es ist sehr schwer zu entscheiden, ob hier der Beweis vorliegt, daß es sich um regenerierendes reticulo-histiocytäres Gewebe des Milztransplantates handelt; zumal keine milztypischen Strukturen sichtbar sind. Dieses histiocytäre Gewebe sieht nicht wie das Granulations- und Resorptionsgewebe aus, das man sonst um die partiell oder total nekrotischen Transplantate findet. Die Frage Regeneration oder Repopulation wird bedeutsam. Wenn man die anderen Präparate dieser drei Serien bedenkt, so gewinnt jedoch die andere Möglichkeit, daß es sich um eine besonders ausgeprägte Form der chronischen proliferativen Entzündung handelt, an Wahrscheinlichkeit. Die Frage - partielle Regeneration des Reticulums oder chronische Entzündung - muß offen bleiben.

Wir haben in den Versuchen den Aufbewahrungslösungen kein Sulfonamid oder Antibioticum zugesetzt. Das Gewebe war lange genug der Möglichkeit zur Infektion ausgesetzt. Wieweit also die Superinfektion das Schicksal des Transplantates beeinflusst, insbesondere wieweit die Superinfektion mit den Mikroabszessen und die Non-Infektion mit dem Narbengewebe in Zusammenhang zu bringen ist, muß dahingestellt bleiben.

Besprechung der Tief-Frier-Serien ("deep-freezing"
-76° C)

Die Konservierung von Milzgewebe hat gewisses Interesse erlangt, seit JACOBSON und Mit. 1951 zeigten, daß lethal bestrahlte Mäuse durch Implantation von Milzzellen in die Bauchhöhle überlebten. BARNES und LOUITT führten aus, daß nicht ein humoraler Faktor, sondern die lebenden Milzzellen für die Schutzfunktion verantwortlich seien (1953). Sie konnten 1955 lethal bestrahlte Mäuse bis 30 Tage nach der Bestrahlung mit der Injektion von auf -70°C in 15% glycerinhaltigen Serumlösungen eingefrorenen Milzzellen am Leben erhalten. In den folgenden Jahren wurden diese Versuche von anderen Autoren bestätigt. FERREBEE et al. haben das Leben von lethal bestrahlten Mäusen mit in glycerinhaltigen Lösungen eingefrorenen Knochenmarkszellen verlängern können. Sie erzielten allerdings auch Erfolge mit Knochenmarkszellen, die ohne Glycerin in Albuminlösungen eingefroren waren. Die erste autologe Knochenmarktransplantation beim Menschen (die Zellen wurden in 30%iger Tyrode - lösung eingefroren) wird von KURNICK und Mit. (1958) nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 200 r bei einem metastasierenden Hodentumor berichtet. WOODRUFF und NOLAN wandten diese Technik bei hoffnungslosen Fällen Krebskranker nach intensiver Cytostatikatherapie zur Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems an. Die Gefahr der "Sekundärkrankheit" (der Wirt wird von den immunologisch kompetenten Zellen "überwältigt" und geht zu Grunde) muß bei solchen therapeutischen Versuchen mit homologen Zellen im Auge behalten werden. In den hier zu besprechenden Versuchen wurde nicht wie in den eben angeführten Arbeiten mit Zellsuspensionen gearbeitet, sondern mit Gewebestückchen.

Nach den histologischen Befunden überlebt Milzgewebe in dünnen Scheibchen unsere Art des Einfrierens in den angewandten Medien - mit und ohne Glycerin (16,6 oder 25 Vol%) - nicht. Das verpflanzte Gewebe wird nach unserer Aufbewahrung (1h Diffusionszeit und 1h "deep-freezing") in Narbengewebe verwandelt, das mit zunehmender Beobachtungszeit durch große runde Fettgewebszellen ersetzt wird. Die schon für die Serien D-F angeführten Überlegungen, ob die zeitweilig in dem Transplantatrest zu sehenden Zellkerne transplantateigen, d.h. also eine gewisse Zeit den Aufbewahrungsmodus überlebende Zellen sind, oder ob sie vom Muttergewebe in das Transplantat emigriert sind und so mit dazubeitragen, das Transplantat in eine Narbe umzuwandeln, trifft für diese Serien ebenfalls zu. Unabhängig von dieser Frage ist das Faktum festzustellen, daß nach 4 Wochen das gesamte verpflanzte Gewebe in Narben- oder Fettgewebe umgewandelt ist. (Abbildung 23).

Besprechung der Schädigungsmöglichkeiten während des Einfrier- und Auftauprozesses.

Aus einem Vortrag von SILVAY und Mit. (1966) entnehmen wir die pH-Werte einiger Lösungen, die in der Klinik oft als Infusionslösungen angewandt werden

5% Glucose	4,12
Rheomacrodex	
in 0,9% NaCl	5,10
Ringer-Lsg.	5,96
5% Laevulose	5,32

Im Organismus werden diese Flüssigkeiten durch geringe Mengen Bicarbonat in den physiologischen Bereich von 7,3 - 7,4 gebracht; nach SILVAY et al. werden zur Korrektur der oben angeführten Lösungen 0,1 - 0,5 Milliäquivalent pro 1000 ml benötigt.

Diese Angaben werden durch BEERHALTER (1966) unterstützt, der durch hinzufügen von 20 ml Blut vom pH-Wert 7,30 zu 500 ml 4,5% niedermolekulares Dextran (entspricht dem Rheomacrodex) eine Korrektur der Infusionslösung auf den pH von 7,28 messen konnte. EASCOTT und Mit. geben bei ihren Versuchen für Ringer-Lösung mit 15% Glycerin einen pH-Wert von 6,0 an. Wir haben für Rheomacrodex einen pH-Wert zwischen 5,6 - 5,7 und für Macrodex zwischen 5,5 - 5,6 gemessen.

Der pH-Wert des aufbewahrenden Mediums ist für die Erfolgsrate bei diesen Versuchen nicht zu vernachlässigen. So stellt PARKES (1958) eine deutliche Korrelation zwischen pH-Wert des Mediums und der erfolgreichen Aufbewahrung von Ovarien der Ratte auf. Bei einem pH-Wert von 7,8 sah er nur Erfolge, bei der Aufbewahrung bei einem pH von 4,8 keine; die Verschiebung zur alkalischen Seite war ebenfalls von Nachteil. RIDGE (1957) berichtet über die Schädigung der Corneaendothelzellen des Kaninchens durch 1% Glycerin bei einem pH von 5,85. Diese Glycerinkonzentration genügt, um die O_2 -Konsumption des Gewebes zu blockieren. Bei einem pH-Wert von 8,8 vertrug das Gewebe eine Glycerinkonzentration von 10% und die O_2 -Konsumption betrug dabei nach Einfrieren auf $-79^{\circ}C$ und Auftauen 75% des ungeschädigten Gewebes. Von EASCOTT et al. wurde jedoch Cornea des Menschen bei einem pH von 6,0 und 15% Glycerin eingefroren und der Wert war nach dem Auftauen fast immer gesunken (4,0-5,8); die klinischen Ergebnisse waren über einen Zeitraum von 10 Monaten in 3/4 der Fälle zufriedenstellend, wobei kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Mißerfolg und der am ausgeprägtesten Acidose bestand. Bei unseren Versuchen wäre zu überlegen, ob die Aufbewahrungsmedien zu acidotisch waren. Jedoch wurden ebenso saure Medien bei den verschiedensten

Gewebe mit Erfolg verwandt, so daß darin wohl nicht die einzige Schädigungsmöglichkeit zu suchen ist (A.U. SMITH und PARKES 1953; R. DEANESLY 1953; HAUSCHKA et al. 1959).

Das niedermolekulare Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht 40 000) hat in der 10%igen Konzentration einen wesentlich höheren kolloidosmotischen Druck als Serum. Das hochmolekulare Dextran (Handelsname Macrodex, durchschnittliches Molekulargewicht 75 000) entspricht etwa in der 6%igen Konzentration den physiologischen Verhältnissen (BRETSCHNEIDER). Untersuchungen von OEFF bestätigen das hohe Wasserbindungsvermögen des hochmolekularen Dextrans, das von der herstellenden Firma mit 21 ml/g Substanz angegeben wird. Es ist daher bei der Verwendung dieser Flüssigkeiten - teils durch den hohen kolloid-osmotischen Druck, teils auf Grund des Wasserbindungsvermögens - mit einer dehydrierenden Wirkung auf suspendiertes Gewebe zu rechnen. LYET nahm eine vorwiegende Schädigung des Gewebes beim Einfrierprozeß durch die Entstehung der Eiskristalle an. Er versprach sich durch dehydrierende Maßnahmen eine gewisse Wirkung. Durch LOVELOCK werden die hohen Elektrolytkonzentrationen als Hauptschädigungsmechanismus angesehen. Trotzdem betont auch LOVELOCK die Möglichkeit der mechanischen Schädigung durch die Eiskristalle. Durch BARSAMIAN u. Mit. wurden die Möglichkeiten der partiellen Dehydratation in der Gewebekonservierung erneut herausgestellt. Ihnen gelang es, 2 Hundeherzen nach partieller Dehydrierung (22% bzw. 27%) über 3-4 h, die in 70% Glycerin nochmal insgesamt 3 h bei -8°C aufbewahrt wurden, nach Erwärmen und Rehydrieren wieder normal schlagen zu lassen. Durch die Verwendung von dextranhaltigen Lösungen hofften wir, eventuell die Eiskristallisation beeinflussen zu können. Die negativen Ergeb-

nisse würden jedoch nur dann eindeutig diese Vorstellungen widerlegen, wenn keine anderen Schädigungsmöglichkeiten in Betracht kämen. LEHR et al. haben mit Konservierungsversuchen von Haut in dextranhaltigen Lösungen bei -79°C keine Erfolge erzielt. Bei den Bemühungen, ganze Organe aufzubewahren, hat sich das niedermolekulare Dextran sehr bewährt (LARGIADER); jedoch wird dabei in Hypothermie - um das Problem des raschen Wärmeaustausches beim Einfrieren und Auftauen bei Organen zu umgehen - gearbeitet.

Bei der Verwendung einer "protektiven Substanz" (Glycerin oder Dimethylsulfoxyd) in Versuchen Gewebe durch Einfrieren zu konservieren, ist die Frage nach der optimalen Konzentration zu stellen. LOVELOCK gibt die erforderliche Glycerinkonzentration für Erythrocyten mit 20-25% an. CHAPLIN und MOLLISON (1953) fanden, daß Erythrocyten durch 30%iges Glycerin wirkungsvoller als durch 15% während des Einfrierprozesses geschützt seien. Für die Konservierung von Erythrocyten haben sich 30 Vol% Glycerin über Jahre bewährt (CHAPLIN und HUGGINS). Für Tumorzellen gibt es keine einheitlichen Konzentrationsangaben. HAUSCHKA et al. fanden, daß einige Tumorarten durch 20% Glycerin schwer geschädigt wurden, während 10% von allen Arten gut vertragen wurde. Aus der Arbeit von SWIM, HAFF und PARKER mit verschiedenen Säugetierzellen geht ebenfalls hervor, daß es keine von vornherein optimale Glycerinkonzentration für eine bestimmte Zellart gibt. Bei unseren Versuchen haben wir uns in etwa an den Konzentrationen der Blutkonservierung orientiert. Für weiße Blutzellen liegen keine positiven Erfahrungen in der Aufbewahrung vor (A.U. SMITH). Bei unseren negativen Ergebnissen ist also zu überlegen, ob die Glycerinkonzentration falsch gewählt wurde.

In Leerversuchen haben wir Milzgewebe bei den entsprechenden Glycerinkonzentrationen 1 h aufbewahrt. Es fällt auf, daß das Gewebe nach kurzer Zeit dunkler wird und bleibt. Im histologischen Bild nach 4 Wochen Transplantationszeit ist das Milzgewebe zum Teil untergegangen und durch Narbengewebe ersetzt. Es sind aber immer Regenerate mit organotypischer Struktur zu finden. Im Vergleich mit den Serien glycerinfreier Medien scheint das verpflanzte Gewebe stärker geschädigt. Die angewandten Konzentrationen scheinen etwas zu hoch gewesen zu sein, jedoch war eine absolut toxische Konzentration - wie die Regeneration beweist - nicht gewählt worden, und insofern sind sie nicht allein für die negativen Ergebnisse verantwortlich zu machen.

PERRY et al. wiesen auf eine Möglichkeit des Schädigungsmechanismus bei Einfrierversuchen hin: wurden Zellsuspensionen von epithelialen Zellen der Haut in festen verschlossenen Röhrchen auf -195°C oder -79°C schnell eingefroren, so wurde anschließend kein Wachstum in der Zellkultur gesehen. Wurde aber der Stopfen mit einer dünnen Nadel durchstoßen und so der Luft innerhalb des Röhrchens Expansion und Kontraktion während des Einfrier- und Auftauvorganges erlaubt, so überlebten die Zellen diesen Prozeß. Bei unseren Versuchen waren die Röhrchen mit einem Gummistopfen fest verschlossen.

Die Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit ist bei diesen Versuchen von ausschlaggebender Bedeutung. Beim langsamen Einfrieren geht die Eiskristallbildung ausschließlich extrazellulär vonstatten (MERYMAN). Durch die steigenden Elektrolytkonzentrationen außerhalb der Zelle muß das intrazelluläre Wasser auf Grund des osmotischen Gefälles die Zelle verlassen - die Zellen werden dehydriert.

Es bilden sich durch das langsame Einfrieren große extrazelluläre Eiskristalle, die sich durch die Anlagerung des zellulären Wassers vergrößern. Nach MERYMAN können also die Zellen, die ohne Schaden dehydriert werden können, auch langsam eingefroren werden.

Bei schnellem Einfrieren bilden sich kleine Eiskristalle sowohl intra- wie auch extrazellulär. Will man die Zellen nicht schädigen, so muß man sie so schnell einfrieren, daß sich so kleine Eiskerne bilden, die trotz ihrer intrazellulären Lage nicht zum Zelltod führen. MERYMAN glaubt-auf Grund der physikalischen Gegebenheiten des Wärmeaustausches beim Einfrieren und Auftauen -, daß dies bei kleinem Zellmaterial (1-2 mm im Durchmesser) bei hohem Kältegradienten (flüssige Luft oder flüssiger Stickstoff) möglich sei. Diese Konzeption kommt den Vorstellungen von LYET entgegen, der "ultra-schnelles" Einfrieren zur "Vitrification" (labiler glasartig-amorpher Zustand von unterkühlten Flüssigkeiten ohne Eiskristalle) des Gewebes als theoretisch erfolgreiche Methode empfahl. Untersuchungen von REY mit einem Licht-Mikroskop ließen diese Methode möglich erscheinen. Später hat MERYMAN (1960) durch Arbeiten mit Röntgenstrahlen seine eigenen und REY's Ansichten korrigiert und wahrscheinlich gemacht, daß es eine Vitrification nicht gibt. In lichtoptisch glasartigen Flüssigkeiten werden immer kleinste Eiskerne gebildet (n. A.U. SMITH).

Durch die Gefahr der "Re-Kristallisation" wird die Aufbewahrung und das Auftauen von schnell eingefrorenem Gewebe problematisch. Kleine Eiskerne können durch Steigen der Temperatur auf -50°C beträchtlich an Größe zunehmen. Die Gefahr für die Zelle ist bei intrazellulären Eiskernen evident (MERYMAN). BILLINGHAM und MEDAWAR haben als erste

klar herausgestellt, daß die Auftaugeschwindigkeit fast wichtiger ist als die Einfriergeschwindigkeit. Bei Konservierungsversuchen mit Haut vom Kaninchenohr in 15%igem Glycerin spielte für beste Erfolge die Einfriergeschwindigkeit keine Rolle, wenn nur möglichst schnell aufgetaut wurde. Heute ist es gesicherte Tatsache, daß schnelles Auftauen garantiert sein muß. Unsere Auftaumethode entspricht der von BILLINGHAM und MEDAWAR.

Sowohl beim Einfrieren wie beim Auftauen muß das Gewebe durch die kritische Phase der schädlichen Elektrolytkonzentrationen. Dieser Gefahr kann man durch die protektiven Substanzen (Glycerin, DMSO) entgegenwirken. Gleichzeitig ist von diesem Gesichtspunkt das möglichst rasche Durchschreiten dieser Gefahrenzone wünschenswert. Das Phänomen des Wärmeschock (thermal shock - LOVELOCK) verbietet es jedoch manche Gewebe in bestimmten kritischen Zonen zu schnell einzufrieren. Das beste Beispiel für den Wärmeschock sind die Bullenspermien (A.U. SMITH). Bullenspermien werden durch einen plötzlichen Temperatursturz von $+37^{\circ}\text{C}$ auf 0°C irreversibel geschädigt. POLGE hat noch kompliziertere Verhältnisse aufgezeigt. Bullenspermien (in Glycerin mit Eidotter und Natriumcitrat) überleben rasches Abkühlen von $+5^{\circ}\text{C}$ auf -20°C und dann im zweiten Schritt auf -79°C ; dagegen sterben sie bei schnellem Einfrieren von -20°C auf -196°C und von -15°C auf -79°C ab. Zwischen -15° und -20°C ist die Abkühlrate von $1-2^{\circ}\text{C/sec.}$ tödlich, dagegen vertragen sie ab -30°C eine Abkühlgeschwindigkeit von 15°C/sec. Bullenspermien dürfen also in der "kritischen Phase" -15° bis -20°C nur mit $0,25-0,5^{\circ}\text{C/sec.}$, von -20° bis -30° nur mit $1-2^{\circ}\text{C/sec.}$ und von da ab mit 15°C/sec eingefroren werden.

In unseren Versuchen haben wir die Temperatur nicht kontinuierlich mitgeschrieben, sondern uns aus mehreren Meßpunkten eine Kurve aufgezeichnet, die uns einen ungefähren Anhalt über die Geschwindigkeit des Temperaturabfalls vermittelt. Die Einfriergeschwindigkeit betrug bis -50° etwa $0,85^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$ Nach den Arbeiten mit Knochenmarkzellen und Milzszellsuspensionen, die mit einer Einfriergeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ erfolgreich waren (FERREBEE et al., BARNES und LOUTIT, SYMES und RIDDELL) müssen wir annehmen, daß für Milzscheibchen die Einfrierrate von ca. $0,85^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$ zu schnell gewesen ist. Die Folgen des Wärmeschocks lassen sich nicht von den Folgen anderer schädigender Faktoren exakt trennen. Bei unseren Versuchen liegt es jedoch nahe, daß der Wärmeschock mit zu dem Untergang des Milzgewebes beigetragen hat.

Mit dem Beginn der "Glycerinära" 1949 durch POLGE, SMITH und PARKES ergaben sich in der Cryobiologie utopische Aspekte. Die Gewebekonservierung - die Möglichkeit des "latenten Lebens" - schien in greifbare Nähe gerückt. Großartige Erfolge wurden erzielt. Zellsuspensionen (Erythrocyten, Spermien) können heute jahrelang konserviert werden. Der Wunschtraum, Organe und sogar Individuen einfrieren zu können, hat sich nicht erfüllt. In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich, daß mit der Anwendung der protektiven Substanzen die komplexen Probleme der Konservierung vitaler Gewebe nicht schlagartig gelöst werden, sondern es wird die Gelegenheit geboten, diese Probleme besser zu erforschen.

Zusammenfassung

In einem Vorversuch wird der Wert der Scheibchentransplantation für Milzgewebe untersucht. Händlerratten wurde die halbe Milz reseziert; anschließend wurden den Tieren 12-15 dünne Milzscheibchen autolog, heterotop (auf die Rückenmuskulatur) transplantiert. Nach 4 Wochen wurde die abdominelle Restmilz entfernt; kein Tier starb nach diesem Eingriff. Bei der gleich großen Kontrollserie (18 Tiere) starben 60% der Tiere nach Splenektomie an der Bartonellenanämie. Es kann also festgestellt werden, daß die Scheibchentransplantation bei Milzgewebe in der Lage ist, ein funktionierendes "Ersatzorgan" aufzubauen.

In dem Hauptversuch wird die Ischaëmiezeit von Milzgewebe untersucht (15 Serien, 146 Tiere). Der Schädigungsgrad des aufbewahrten Gewebes wird an Hand der autologen heterotopen Transplantation nach histologischer Aufarbeitung (Beobachtungszeitraum 1, 2 und 4 Wochen) abgeschätzt. Die Transplantation dient als "Vitalitätstest" des konservierten Gewebes. Folgende Aussagen können gemacht werden:

1. Milzgewebe toleriert die Ischaëmiezeit bis 2 h bei Zimmertemperatur (ca. 22°C) ohne wesentliche Schäden.
2. Nach einer Aufbewahrungszeit von 24 h bei ca. +5°C sind nur sehr kleine Regenerate zu finden.
3. 24 h bei +5°C dürfte die längste - auch nur teilweise - tolerable Ischaëmiezeit für Milzgewebe in Hypothermie sein.
4. Aufbewahrungsversuche bei -13°C verliefen erfolglos. (Eine Ausnahme wird diskutiert.)
5. Alle Versuche, mit einem relativ schnellen Einfriermodus auf -76°C die Regenerationsfähigkeit von Milzgewebe zu erhalten, hatten keinen Erfolg.

6. Die Verwendung von Glycerin als protektive Substanz war dabei ohne sichtbaren Einfluß. Die Schädigungsmöglichkeiten beim Einfrier- und Auftauprozess werden an Hand der vorgelegten Versuche diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. **ALBRECHT:** "Ein Fall von sehr zahlreichen, über das ganze Peritoneum verstreuten Nebenmilzen" Zieglers Beitr. z. Path. Anat. u. z. allg. Path. 20: 513, 1896 zit. nach Schilling.
2. **ALLGÖWER, M., T.G. BLOCKER, B.W.D. ENGLE:** "Some immunological aspects of auto- and homografts in rabbits, tested by in vitro and in vivo techniques". Plast. Reconstr. Surg. 9: 1, 1952
3. **ALLGÖWER, M., L. HULLIGER:** "Organ-Homotransplantation" in P. Miescher und K.O. Vorlaender "Immunpathologie in Klinik und Forschung". Thieme - Stuttgart, 1961.
4. **ANDINA, F.:** "Die freien Hauttransplantationen einschließlich der Frage der Homotransplantation." Erg. Chir. 38: 177, 1953.
5. **ANDINA, F.:** "Immunologische Fragen bei Transplantationen in Forschung und Klinik" Regensburger Jahrbuch f. ärztl. Fortbildung Bd. IX: 232 Schattauer-Stuttgart 1961.
6. **AUST,** GUTTMANN "Factors involved in homograft tolerance" JAMA Vol 183 (10): 857. 1963
7. **BAIN, W.H.:** "Arterialhomografts: Their preservation and clinical application". Scott. Med. J. Vol. 4, 10: 493, 1954.
8. **BARNES, D.W.H.; J.F. LOUIT:** "protective effects of implants of splenic tissue." Proc. R. Soc. Med. 46: 251, 1953
 ----- "Immunological status and longevity of radiation-chimeras." Proc. Roy. Soc., B, 150: 131, 1959.
9. **BARNER, H.B.; E.A. SCHENK** "Autotransplantation of the frozen-thawed spleen." Arch. Path. Vol. 82: 3, 1966
10. **BARSAMIAN, E.M.; St. W. JACOB, S.C. COLLINS, O.E. OWEN:** "Preliminary studies of the transplantation of supercooled hearts". Trans. Bull. 7 (25), 2: 405, 1960

11. BELTRAN, J.C.; H.T. BLUMENTHAL: "Effects of dehydration-freezing-thawing on the preservation and homotransplantability of renal tissue." J. Urol. Vol. 82: 4, 1959
12. BEERHALTER, H.; J. HÖLZLE, G. HARBAUER "Der Einfluß neuartiger Dextran-Kombinationspräparate auf Kreislauf, Atmung, Urinausscheidung und Elektrolyte." Langenbecks Arch. klin. Chir. Bd. 316: 620, 1966
13. BEYER, H.: Lehrbuch der Organischen Chemie S. 228-232, Hirsch Verlag, Leipzig 1961
14. BILLINGHAM, R.E. "The storage of skin" in Ciba Foundation, Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
15. BILLINGHAM, R.E.; P.B. MEDAWAR "The freezing, drying and storage of mammalian skin." J.exp. Biol. 29: 454, 1952
16. BILLINGHAM, R.E.; L. BRENT, P.B. MEDAWAR: "Extraction of agents causing transplantation immunity." Trans. Bull. 4: 67, 1957
17. BLUMENTHAL, H.T.; L.B. WALSH: "Survival of guinea pig thyroid and parathyroid autotransplants previously subjected to extremely low temperatures." Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 73, 1: 62, 1950
18. BRETSCHNEIDER, H.J.: Diskussionsbeitrag zum Vortrag Nr. 95 der Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 83. Tagung München 1966.
19. BROSIG, W.; R. NAGEL "Nierentransplantation" Walter De Gruyter & Co. 1965.
20. BÜCHERL, E.S.; M. SCHWAB; "Der Einfluß der Milz auf das weiße Blutbild." Klin. Wschr. 1951, 731
21. BÜCHERL, E.S.; "Grundfragen der Organtransplantation". Klinische Medizin Jg. 18,4: 149, 1963

22. BÜCHERL, E.S.: "Organtransplantation und Organersatz: Grenzen unserer chirurgischen Aufgaben." Med.Klinik 58,15: 636, 1963
23. BÜCHERL, E.S.: "Allgemeine Problematik und derzeitiger Stand der Organtransplantation". Langenb. Arch. f. klin. Ch. 306,1:5, 1964
24. BÜCHERL, E.S.: "Der Organersatz - Neue Wege heutiger medizinischer Forschung." Universitas 20,8: 785, 1965
25. BÜCHERL, E.S.; R. EISELE, M. NASSERI: "Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Transplantationstoleranz." Langenbeck's Arch. Klin. Chir. 313: 717, 1965
26. CHAPLIN, H. jr.; P.L. MOLLISON: "Improved storage of red cells at -20°C". Lancet 1: 215, 1953
27. CHAPLIN, H. jr.; P.L. MOLLISON: "Preservation of blood" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
28. CARREL and GUTHRIE: "Remote results of the replantation of the kidney and the spleen." J. of exp. Med 12,2, 1910 zit. nach E. ABDERHALDEN Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden Abt. V, Teil 1, S 365, 1927
29. CARREL and GUTHRIE: "Transplantation of blood vessels and organs". Brit. med. J. 2: 1796, 1906
30. DEANESLY, R.: "Histological evolution of rat gonadal tissue transplanted after freezing and thawing" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
31. DEANESLY, R.: "Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing." Proc. Roy. Soc. Ld. Serie B 147: 412, 1957
32. DEMPSTER, W.J.: "Kidney homotransplantation" Brit. J. Surg. 40: 447, 1953
33. DETERLING, COLEMAN, PARSHLEY: "Experimental studies of the frozen homologous aortic graft." Surgery 29: 419, 1951

34. DUANE: "The respiration of the stored cornea." Am. J. Ophthalm. 31: 1400, 1948.
35. DUESBERG, R.; J. FISCHER: "Die szintigraphische Darstellung der Milz als Ausdruck ihrer Lage und ihres Funktionszustandes." Med. Klin. 59, 11: 429, 1964
36. DUESBERG, R.; GRAMLICH, F. "Die Milz, ein defensives und aggressives Organ". Dtsch. med. Wschr. 89 Jg. Nr. 4: 153, 1964.
37. EARLE, W.R.: "Long-Term, Large-Scale, Tissue Culture" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
38. EASCOTT, H.H.G.; A.G. CROS, A.G. LEIGH, D.P. NORTH: "Preservation of corneal grafts by freezing." Lancet 1: 237, 1954
39. EGDHAL, R.H.; R. HARRIS: "In vivo tolerance of canine kidneys to glycerol perfusion". Trans. Bull. Vol. 6 (23), 3: 110, 1959
40. EHRHARD: "Erfolgreiche Transplantation der Milz." Inaug.-Dissertation Königsberg 1897 zit. nach LEXER.
41. FALTIN, R.: "Milzartige Bildungen im Peritoneum, beobachtet ca. 6 Jahre nach einer wegen Milzruptur vorgenommenen Splenektomie." Dt. Ztschrft. f. Chir. 110: 160, 1911.
42. FERREBEE, J.W.; D. BILLEN, I.M. URSO; W.C. LU, E.D. THOMAS, C.C. CONGDON: "Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow." Blood 12: 1096, 1957
43. FRYER; BROWN: "The effect of various storage methods on the viability of skin grafts." Trans. Bull. Vol. 3, 3: 96, 1956
44. GARABELLA, J.J.; L.J. HAY: "Autotransplantation of Spleen: Splenosis Ann. Surg. Vol 140, 1: 107, 1954
45. GAILLARD: "Transplantation of cultivated parathyroid gland tissue in man". in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London.

46. GERICKE, D.; K. ENGELBART: "Über die Konservierung von Tumorgewebe bei -70°C (Versuche zur Einrichtung einer Tumorbank). Z. Krebsforsch. 65: 147, 1962
47. GRÜNERT, R.D.; K. OEFF, H. SCHULZE: "Eigenschaften und Indikationen von Rheomacrodex." Anaesthesist Bd. 11,9: 302, 1962
48. HACKENSELLNER, H.A.: "Bedeutung der Gewebekonservierung für die Transplantationsschirurgie." Ärztl. Sammelblätter 51,6: 196, 1962
49. HANKS; WALLACE: "Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71,2: 196, 1949.
50. HAUSCHKA, Th.; J.T. MITCHELL, D.J. NIEDERPRUEM: "A reliable frozen tissue bank: Viability and stability of 82 neoplastic and normal cell types after prolonged storages at -78°C ." Canc. Res. 19 (6,1): 643, 1959
51. HERZOG, K.H.: "Entwicklungsstand der Gewebe- und Organtransplantation." Med. Klinik 33: 1325, 1963
52. HERRATH, E.v.: "Bau und Funktion der normalen Milz." Walter De Gruyter & Co. Berlin 1958.
53. HÖFER, W. : "Das Verhalten ruhender und aktiver Lymphknoten nach Autotransplantation." Inaugural-Dissertation Berlin 1963.
54. HOPPE, G.: Persönliche Mitteilung 1966.
55. HUGGINS, Ch.E.: "Frozen blood-clinical experience." Surg. 60,1: 77-84, 1966
56. HUFNAGEL, Ch.: "Experimental and clinical observations on the transplantation of blood vessels." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
57. JACOB, St.W.; O.E. OWEN, S.C. COLLINS, J.E. DUNPHY: "Survival of normal human tissue frozen to $-272,2^{\circ}\text{C}$ ". Trans. Bull. Vol. 5,4: 428, 1958

58. JACOBSON, L.O.: "Evidence for a humoral factor or factors in recovery from radiation injury. A review." *Cancer Res.* 12: 315, 1952
59. JONES, N.C.H.; P.L. MOLLISON, M.A.ROBINSON: "Factors affecting the viability of erythrocytes stored in the frozen state." *Proc. Roy. Soc. Id. Serie B* 147: 476, 1957
60. JORDAN; COLLINS, HETTIG: "A study of the lethal effects of total body irradiation." *JAMA* 183 (10): 859, 1963
61. JONES, P.F.: "The behavior of embryonic endocrine homografts: An experimental study of adrenal grafts, with notes on an ovarian graft in a young woman." in Ciba Foundation, Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
62. KAISER, E.; W. RINDT: "Milz und Endokrinium." *Med. Klinik* 60,25: 985, 1965.
63. KLEIN; REVERZ, KLEIN: "Experiences with a frozen tumor bank." *Transpl. Bull. Vol.* 4,1: 31, 1957
64. KNAKE, E.: "Über Transplantation von Lebergewebe." *Virch. Arch.* 319: 321, 1950
65. KNAKE, E.: "Über Transplantation von Milzgewebe." *Virch. Arch.* 321: 508, 1952
66. KNAKE, E.: "Über einen Angriffspunkt von Gewebsverträglichkeitsgenen nach Transplantationsexperimenten an homozygoten und heterozygoten Ratten." *Ztschr. Naturforsch.* 8 b: 324, 1953
67. KNAKE, E.: "Über eine Möglichkeit, das Schicksal von Milzhomotransplantaten zu beeinflussen." *Ztschr. Naturforsch.* 8b: 324, 1953
68. KNAKE, E.: "Über Homotransplantation von Milzgewebe bei Ratten." *Virch. Arch.* 324: 1, 1953
69. KNAKE, E.; ENGELBARTH, K.: "Die Wiederherstellung von Schilddrüsenparenchym nach Autotransplantation am Kaninchen." *Virch. Arch.* 329: 373, 1956.

70. KÖHNLEIN, H.E.: "Die Möglichkeiten der Homoio- Hetero- und Allo-transplantation bei der Behandlung von Schwerstverbrannten." Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 80, Springer Verl. 1965.
71. KORT, J.: "Probleme der Transplantation". Dtsch. med. Wschr. 89 Jg. Nr. 40 1903, 1964
72. KÜTTNER: Diskussionsbeitrag Berl. Klin. Wschrft. 47: 1520, 1910
zit. nach Faltin.
73. KURNICK, N.B.; A. MONTANO, J.C. GERDES, B.H. FEDER: "Preliminary observations on the treatment of post-irradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow." Ann. intern. Med. 49: 973, 1958.
74. LARGIADÈR, F.: "Organtransplantation". Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1966
75. LAUDA, E.: "Über schwere anämische Zustände bei splenektomierten Ratten." Klin. Wschr. 1925, 1587
76. LEHR, H.B.; R.B. BERGGREN, P.A. LOTKE, L.L. CORIELL: "Permanent survival of perserved skin autografts." Surg. 56,4: 742-746, 1964
77. LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie S. 160
Georg Thieme - Stuttgart 1959
"Lebertransplantation in die Bauchhöhle". Verh. Dtsch. Path. Ges. 27. Tag.
78. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie, S. 254, 14. Aufl. 1934
Walter De Gruyter & Co. 1959
79. LEXER, E.: "Die freien Transplantationen." Neue Deutsche Chirurgie, Bd. 26a, 1919, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
80. LONGMIRE; CANNON and WEBER: "General surgical problems of tissue transplantation." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
81. LOVELOCK, J.E.: "The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing." Biochimica et Biophysica Acta 10: 414, 1953.

82. LOVELOCK, J.E.: "Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing." *Biochimica et Biophysica Acta* 11: 28, 1953.
83. LOVELOCK, J.E.: "Biophysical aspects of the freezing of living cells." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues, Churchill, London 1954.
84. LOVELOCK, J.E.: "The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing." *Proc. Roy. soc. Ld. Serie B* 147: 427, 1957
85. LOVELOCK, J.E.; M.W.H. BISHOP: "Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide." *Nature* 183: 1394, 1959.
86. LUSENA, C.V.; W.H. COOK: "Ice propagation in system of biological interest. I. Effects of membranes an solutes in a model cell system." *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 46,1: 232. 1953.
87. LUSENA, C.V.; W.H. COOK: "Ice propagation in system of biological interest. II. Effect of solutes at rapid cooling rates." *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 50,2: 243, 1954
88. LUSENA, C.V.: "Effect of solutes on nucleation and growth of ice crystals". *Arch. Biochem. Biophys* 57: 277, 1955
89. MASSHOFF, W.: "Über Reaktionen des lymphatischen Gewebes." *Med. Welt* 26: 1393, 1960
90. MASSHOFF, W.: Persönliche Mitteilung 1966.
91. MANN, F.G. ; J.T. PRIESTLEY, J. MARKOWITZ, W.M. YATEX: "Transplantation of the intact mammalian heart." *Arch. Surg.* 26: 219, 1933
92. MEDAWAR, P.B.: "General problems of immunity" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London, 1954.
93. MERYMAN: "Physical limitations of the rapid freezing method." *Proc. Roy. Soc. London, Serie B* 147: 452, 1957

94. MOESCHLIN, S.: Die Milzpunktion, Basel 1947.
95. MORGAN, J.F. ; L.F. GUERIN, H.J. MORTON:
"The Effect of low temperature and storage on the viability and mouse strain specificity of ascitic tumor cells." Cancer Research 16: 907, 1956
96. MOSS, G.S.; P.C. REED, A.G. RIDDELL: "Observations on the effects of glycerol on the cold storage of the canine liver." J. Surg. Res. VI,4: 147-151, 1966
97. NASSERI, M.; R. EISELE, E.S. BÜCHERL: "Experimentelle Untersuchungen zur dystopen und orthotopen Herz- und Herz-Lungenoperation." Langenbeck's Arch. Klin. Chir. 316: 547, 1966
98. NIE, R.; O. MÜHLBOCK: "The viability of some transplantable tumors stored in a frozen tumor bank." Trans. Bull. Vol. 5,2: 65, 1958
99. OEFF, K.: "Über den Wirkungsmechanismus von kolloidalen Plasmaersatzmitteln." Anaesthesist 8: 45, 1959
100. PATE, J.W.: "Transplantation of preserved non-viable tissues" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954
101. PARKES, A.S.: "Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue." J. Endocrin 17: 337, 1958
102. PERRY, EVANS, YOUNG, EARLE und HYATT: "Some recent studies with tissue culture as related to tissue transplantation." Trans. Bull. Vol. 4,1: 28, 1957
103. PERRY, V.P.; G.A. ZINK, G.W. HYATT: "Tissue culture studies of the stored corneal graft". Trans. Bull. Vol. 6 (23), 3: 112, 1959
104. PHILIPPEAUX: "Experiences demonstrators que la rate extirpee sur de jeunes animaux et replacee dans la cavite abdominale peut s'y greffer peut continuer a y vivre et a s'y developper." Compt. rend. de l'acad. des Sciences 1866, S. 431, zit. nach LEXER.

105. POLGE: "Low-temperature storage of mammalian spermatozoa." Proc. Roy. Soc. Ld. Serie B 147: 498, 1957
106. POLGE, C.; A.U. SMITH, A.S. PARKES: "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures." Nature 164: 666, 1949
107. POTERAT, C.M.; R.B. LEWIS; "Methods for analysing thermal stress with tissue culture technique" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954
108. PUTSCHER, W.: "Freie Autotransplantation von Milzgewebe." Centralblatt f. Allg. Path. u. Path. Anat. Ergänzungsheft zum 52. Bd. S. 259, 1931.
109. REY, L.R. "Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblasts. Proc. Roy. Soc. Ld. Serie B 147: 460, 1957.
110. RIDGE, J.W.: "Freezing of cornea." Proc. Roy. Soc., B, 147: 531, 1957.
111. RICKEN, D.; K.O. VORLAENDER: "Transplantationsimmunität, Immunotoleranz, und Runt-Disease". Dt. med. Wschrft. 49:2393, 1963
112. ROE, Ch.; H.R.G. EASTCOTT: "The preservation of arteries and other tissues for clinical use." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954.
113. ROGERS, Ch.S.: "Splenosis". Surgery Vol. 54,5: 743, 1963
114. RUSSELL, P.S.; R.F. GITTES, E.M. SPARROW: "Storage of parathyroid tissue in the frozen state" Surgical Forum Vol. XI: 21 Chicago 1960
115. RYCROFT: "The present state of corneal grafts" in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of tissues. Churchill- London 1954.
116. SALT, R.W.: "Role of glycerol in producing abnormally low supercooling and freezing points in an insect Bracon cephi (Gahan)." Nature, London 181: 1281, 1958.

117. SAUNDERS, F.K.: "The preservation of nerve grafts". in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954
118. SCHERMER, S. : "Blut und blutbildende Organe." aus Pathologie der Laboratoriumstiere Hrgb.: P.COHRs, R. JAFFE, H. MEESEN, Springer-Verlag, 1958
119. SCHILLING, K.: "Über einen Fall von multiplen Nebenmilzen". Virchows Arch. f. path. Anat. u. Phys. 188: 65, 1907.
120. SCHÜLKE, K.; W. HARTEL: "Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der Plasmaviskosität und des Blutvolumens nach Gabe von hoch- und niedermolekularen Dextranen." Langenb. Arch. klin. Chir. Bd. 316: 623, 1966
121. SCOTT, J.H.; J.N. STANNARD: "Relationship between Bartonella muris infection and acute radiation effects in the rat." J. Inf. Dis. 95: 302, 1954
122. SILVAY, J.; M. SCHNORRER, E. SUJANSKY, J.STYK: "Die Auswahl von Ersatzlösungen zur Füllung der Herz-Lungen-Maschine." Langenb. Arch. klin. Chir. Bd. 316: 630, 1966
123. SMITH, A.U.; PARKES, A.S.: "Storage and homografting of endocrine tissues." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London, 1954
124. SMITH, A.U.: "Problems in the resuscitation of mammals from body temperature below 0°C." Proc. Royal Soc. London Serie B 147: 533, 1957
125. SMITH, A.U.: "Freezing and drying biological materials." Nature Vol. 181: 1958
126. SMITH, A.U.: "Biological effects of freezing and supercooling." Monographs of the Physiological Society Nr. 9, London, Ed. Arnold, 1961
127. SNELL, G.D.: "The terminology of tissue transplantation." Transplantation Vol. 2,5: 655, 1964

128. STORSTEEN, K.A.; W.H. REMINE: "Rupture of the spleen with splenic implants: Splenosis". *Ann. Surg.* Vol. 137,4: 551, 1953
129. STRONG, R.: The tissue bank, its operation and management." in Ciba Foundation Symposium: Preservation and transplantation of normal tissues. Churchill, London 1954
130. SWIM, H.E.; R.F. HAFF, R.F. PARKER: "Some practical aspects of storing cells (mammalian) in the dry-ice-chest." *Canc. Res.* 18: 711, 1958
131. SYMES, M.O.; A.G. RIDDELL: "The viability of human spleen cells after cooling in vitro." *Brit. J. Surg.* Vol. 53,9: 794, 1966
132. TAYLOR, A.C.: "The effect of cooling on survival of frozen tissues." *Proc. Roy. Soc. Ld. Serie B* 147: 466, 1957
133. TOOLAN; WINKLER-HAEMMERLI, KORNGOLD: "Studies on transplantable human tumors: I. Freezing." *Trans. Bull.* Vol. 4,4:160, 1957
134. VAN Den BERG, L.; D. ROSE: "Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$." *Arch. Biochem. Biophys.* 81:319, 1959
135. VAN Den BERG, L.: "The effect of addition of sodium and potassium chloride to the reciprocal system: $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ on pH and composition during freezing." *Arch. Biochem. Biophys.* Vol 84,2:305, 1959
136. WELCH, C.S.: "A note on the transplantation of the whole liver in dogs." *Trans. Bull.* 2: 54, 1955
137. WOODRUFF, M.F.A.: "Spezifische Immunologische Toleranz" *Klin. Wochenschrift* 36,6: 245-254, 1958

138. WOODRUFF, M.F.A.: "The Transplantation of tissues and organs."
1960 Charles C. Thomas
Springfield, Illinois, USA
139. WOODRUFF, M.F.A.; B. NOLAN: "Preliminary observations on treatment of advanced cancer by injection of allogenic spleen cells."
Lancet 2:426, 1963
140. WYBURN, G.M.; P. BACSICH: "The fate of frozen stored subcutaneous cartilage homografts."
Trans. Bull. Vol. 3,1:3, 1956
141. ZERKOWITZ, A.: "Vergleichende Untersuchungen an autologen Lymphknotenimplantaten in der vorderen Augenkammer der Ratte."
Inauguraldissertation Berlin 1965.
142. ZUIDEMA, G.D.: "Transplantation of autologous canine thyroid - transplantation after preservation at low temperature -." Arch. Surg. 86:246, 1963

Lebenslauf

Am 25. November 1939 wurde ich als Jüngster der drei Kinder meiner Mutter Lieselotte geb. Falkenstein (1912 - 1939) und meines Vaters, dem Frauenarzt Dr. med. Wilhelm Stockmann (1908 - 1966), in Berlin geboren. Meine Mutter war für mich Elsa Maria Stockmann geb. Botturi (1912 - 1956), die zweite Frau meines Vaters.

Die unruhige Volksschulzeit in verschiedenen Gegenden Deutschlands wurde durch die Einschulung in die Sexta des Evangelischen Gymnasiums in Berlin 1950 abgeschlossen. 1959 bestand ich an diesem humanistischen Gymnasium das Abitur und begann im Sommersemester des selben Jahres mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. 1965 habe ich das Studium an dieser Universität mit dem Staatsexamen beendet.

Seit Juni 1965 bin ich mit Sibylle von Borries verheiratet.

Meine Medizinalassistentenzeit habe ich bis zum April 1967 folgendermaßen abgeleistet: 5 Monate Pathologie (Prof. Dr. Köhn - Städt. Krankenhaus, Neukölln), 6 Monate Chirurgie (Prof. Dr. Bücherl - Städt. Krankenhaus Neukölln), 4 Monate Gynäkologie (Dr. Jung - Städt. Krankenanstalten am Mariendorfer Weg), 3 Monate Strahlenheilkunde (Prof. Dr. Frommhold - Auguste-Viktoria-Krankenhaus Schöneberg), 6 Monate Innere Medizin (Dr. Muth - Auguste-Viktoria-Krankenhaus Schöneberg).

